

Estructura básica de los músculos respiratorios y periféricos en el perro beagle

J.B. Gáldiz^a, J. Palacio^b, F.J. Álvarez^a, N. Hernández^b, M. Mariñán^a y J. Gea^b

^aServicio de Neumología. Hospital de Cruces. Universidad del País Vasco. Bilbao. ^bServicio de Neumología. Unidad de Investigación Respiratoria y Ambiental. Hospital del Mar-IMIM. Fisiopatología (CEXS). Universitat Pompeu Fabra. Barcelona.

FUNDAMENTO: Entre los modelos animales más utilizados en estudios de fisiopatología respiratoria se hallan los caninos, debido fundamentalmente a las características fisiológicas del perro. Sin embargo, consideraciones éticas y legales restringen su utilización en nuestro medio a unas pocas especies.

OBJETIVO: Hemos estudiado las características estructurales básicas de músculos respiratorios y periféricos en el perro beagle, con el fin de aproximar sus valores de referencia para futuros estudios.

MÉTODO: Se han incluido 14 animales jóvenes de esa raza, en los que se tomaron muestras musculares del diafragma costal (DFG), intercostal externo (IE) y músculo de una extremidad (*vasto interno*) (PF). Se analizaron los porcentajes y tamaños fibrilares (inmunohistoquímica, anticuerpos anticadenas pesadas de miosina o MyHC), porcentaje y cantidad de las isoformas de MyHC (electroforesis y ELISA), y grado de daño de membrana (inmunohistoquímica, anticuerpos antifibronectina).

RESULTADOS: Las fibras eran mayores en el IE, sobre todo a expensas de las de tipo II (un 20% mayores). Las fibras resistentes a la fatiga (tipo I) predominaban ampliamente sobre las de contracción rápida (tipo II) en los 3 músculos analizados (DFG, 57 ± 11 frente a 45 ± 12; IE, 58 ± 5 frente a 43 ± 5, y PF, 70 ± 8 frente a 34 ± 7%). La cantidad de fibras híbridas (coexpresión de MyHC rápidas y lentas) era mínima y similar en los tres músculos. La expresión absoluta de MyHC era mayor en el PF que en los músculos respiratorios, con predominio relativo de la isoforma I en DFG y PF, y tendencia similar en el IE. El daño de membrana era muy reducido en los tres músculos.

CONCLUSIONES: Las características fenotípicas de los músculos respiratorios y PF en el perro beagle responden a lo esperable funcionalmente en una raza seleccionada inicialmente para la caza, con mínimos grados de lesión en circunstancias normales, predominio de fibras y proteínas resistentes a la fatiga y fibras mayores en el IE, un músculo que desempeña un papel relevante en la respiración de los perros.

Palabras clave: Músculos respiratorios. Fibras. Cadenas pesadas de miosina.

Basic structure of respiratory and peripheral muscles in the beagle dog

BACKGROUND: The dog is one of the most widely used animals in studies of respiratory physiopathology, mainly because of its physiological characteristics. However, ethical and legal constraints are placed on the use of some species in our context.

OBJECTIVE: We studied the underlying structural features of respiratory and peripheral muscles in the beagle dog in order to suggest reference values for future studies.

METHOD: Fourteen young beagles were selected. Samples were taken from the costal diaphragm (DFG), external intercostal (EI) and vastus medialis (VM) muscles. We analyzed fiber percentages and sizes (immunohistochemistry, using myosin heavy chain [MyHC (monoclonal antibodies), percentages and absolute number of MyHC isoforms (electrophoresis and ELISA), and level of membrane damage (immunohistochemistry, using anti-fibronectin monoclonal antibodies).

RESULTS: In the EI muscle, type I fibers were larger (by 20%) than type II fibers. Fibers resistant to fatigue (type I) predominated greatly over fast contraction fibers (type II) in all three muscles analyzed (DFG 57% ± 11% vs. 45% ± 12%; EI 58% ± 5% vs. 43% ± 5%; and VM 70% ± 8% vs. 34% ± 7%). Few hybrid fibers (co-expression of fast and slow MyHC) were found and their percentages were similar in all three muscles. The absolute expression of MyHC was greater in the VM than in the respiratory muscles, with a relative predominance of the MyHC I isoform in the DFG and VM muscles and a similar tendency in the EI muscle. Membrane damage was very slight in all three muscles.

CONCLUSIONS: The phenotype characteristics of respiratory and peripheral muscles in the beagle correspond to what we would expect functionally for a breed initially selected for hunting, with minimal lesions under normal circumstances, a predominance of fibers and proteins that are resistant to fatigue, and larger fibers in the EI, a muscle that plays a role in respiration in dogs.

Key words: Respiratory muscles. Fibers. Myosin heavy chain.

Ester trabajo ha sido financiado parcialmente por BIOMED (UE) BMH4-CT98-3406, SEPAR 98 y FIS 1998.

Correspondencia: Dr. J. Gea.
Servei de Pneumologia. Hospital del Mar.
Pg. Marítim 27. 08003 Barcelona.
Correo electrónico: jgea@imim.es

Recibido: 5-9-2001; aceptado para su publicación: 17-1-2002.

Introducción

El uso de modelos animales es de gran utilidad en el avance del conocimiento biomédico. Así, es posible diseñar estudios que sería imposible realizar (por motivos éticos o logísticos) en seres humanos. Entre los modelos animales más utilizados en trabajos de fisiopatología

gía respiratoria se hallan los caninos, debido fundamentalmente a las características fisiológicas del perro y también a su relativo bajo coste. Así, muchos de los avances en mecánica pulmonar o de los músculos respiratorios se han realizado en perros de raza cruzada¹⁻⁵. Sin embargo, consideraciones éticas han restringido recientemente la utilización legal de estos animales en España. Aunque la legislación española general todavía no se ha pronunciado⁶, la comunitaria y la de numerosas comunidades autónomas ya sólo permite la realización de estudios en especies animales específicamente “seleccionadas para usos científicos”⁷⁻⁹. En el caso de los perros, una de las pocas razas consideradas como tales es la beagle, inicialmente seleccionada para la caza¹⁰ y con características muy específicas, que la diferencian de los animales más ampliamente utilizados hasta el momento actual. Se establece así un marco en el que el aumento de costes puede contrarrestar las ventajas de trabajar con perros, un animal resistente, fácilmente instrumentalizable y con similitudes fisiológicas con el ser humano. Por contra, la utilización de una sola especie con características genéticas individuales más similares puede ayudar a homogeneizar los estudios con este modelo. El objetivo de este trabajo ha sido describir las características estructurales básicas de los principales músculos respiratorios y de un músculo de las extremidades en la raza canina beagle. Los datos aquí presentados pueden ser de utilidad como referencia para futuros estudios fisiopatológicos.

Método

Población

Se incluyeron en el estudio 14 perros adultos de raza beagle. El estudio fue aprobado por el comité ético de nuestro centro.

Toma de las muestras musculares

Tras la inducción anestésica, el animal fue mantenido en fase hipnótica durante todo el proceso quirúrgico.

Biopsia del diafragma (DFG). Se realizó una laparotomía media subxifoidea de unos 4 cm de longitud. Tras la tracción del hemidiafragma derecho, se obtuvo la muestra en sentido paralelo a la dirección de las fibras.

Biopsia del músculo intercostal externo (IE). Se realizó una incisión de 2-3 cm en la cara anterolateral del hemitórax, profundizándose hasta parrilla costal. Allí se tomó la biopsia del IE, con disección cortante de costilla a costilla.

Biopsia del músculo vasto interno del cuádriceps (músculo periférico) (PF). Se practicó una incisión de 2-3 cm en la cara interna de la pata trasera del animal. La incisión se profundizó hasta el vientre muscular, donde se procedió a la biopsia.

Procesamiento

Una vez obtenidas, las muestras se dividieron en dos porciones. La primera fue incluida en parafina y se utilizó en los procedimientos inmunohistoquímicos. La segunda se introdujo en un criovial, se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su utilización.

Primera porción. La parte incluida en parafina fue cortada en microtomo y se obtuvieron secciones transversales de 3 μm .

– Tinción de hematoxilina de Harris: se realizó sobre los primeros cortes para definir la orientación.

– Técnica inmunohistoquímica: se utilizó para identificar los tipos fibrilares y la presencia de daño de membrana. En ambos casos, las secciones se desparafinaron e incubaron, y se utilizó el correspondiente anticuerpo: *a)* tipificación fibrilar: se realizó a partir de las isoformas de las cadenas pesadas de miosina (MyHC) expresadas por cada fibra; se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-MyHC I (clon MyHCs. Myosin Heavy Chain Type I, Biogenesis, Poole, Inglaterra) y anti-MyHC II (clon MyHCf, Myosin Heavy Chain Type II, Biogenesis); el tamaño del área de sección se calculó a partir del diámetro mínimo, y *b)* daño de membrana: se realizó a partir de la detección de fibronectina intracelular con un anticuerpo monoclonal (Human Fibronectin-IgG Fraction, PC 057, The Binding Site, Birmingham, Reino Unido).

Como segundo anticuerpo se utilizó una anti-IgG de ratón biotilado (Universal Secondary, Biotin, The Binding Site). Las muestras se incubaron con el complejo estreptovidina-peroxidasa para amplificar la reacción. Las imágenes de las muestras se captaron en un microscopio óptico (Olympus BX-50F3, Olympus Optical, Co., Tokio, Japón), y se digitalizaron (programa Pixera Studio, versión 1.2, Pixera Corporation, California, EE.UU.), y se utilizó el programa NIH image 1.6 para realizar las mediciones. Se analizaron siempre más de 100 fibras por corte. Se consideraron fibras *mixtas* o *híbridas* las que coexpresaban ambos tipos de MyHC. Además, se determinó el porcentaje de fibras con fibronectina en su interior (fibras con la membrana dañada).

Segunda porción. Fue homogeneizada, incubada y centrifugada. Para los diferentes procedimientos se determinó en primer lugar la concentración de proteínas totales de la muestra por el método de Bradford.

– Semicuantificación de las isoformas de MyHC por ELISA: se partió de una concentración fija de 20 μg de proteínas totales. Los anticuerpos primarios utilizados y el sistema de detección fueron similares a los anteriormente descritos. Las placas se leyeron en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS, Londres, Reino Unido) a 620 nm.

– Determinación de las proporciones de isoformas de MyHC por electroforesis: se empleó una cantidad de 5 μg de proteínas totales. En cada gel se procesaron conjuntamente las muestras problema, dos muestras control (MyHC I obtenida de músculo *soleus* y MyHC II obtenida de intercostal externo de conejo), y un patrón de peso molecular (*high prestained SDS-PAGE standards*, Bio-Rad). La electroforesis se realizó con un equipo Protean II (Bio-Rad). El gel utilizado fue de poliacrilamida (Bio-Rad), discontinuo. El recorrido electroforético se llevó a cabo durante 20 h, y la tinción de las bandas se realizó con mezcla de Coomassie. Después, el gel fue digitalizado (Gel Doc 2000, Bio-Rad) y se analizaron las bandas (Molecular Analysis, Bio-Rad). Los resultados se expresaron como porcentaje.

– Identificación de las bandas de isoformas de MyHC: previamente a la realización de la electroforesis se procedió a la identificación del patrón de migración de las bandas y análisis de la especificidad de los anticuerpos en el músculo canino. Estos dos objetivos se cumplieron utilizando la técnica de inmunotransferencia e inmunodetección. Para esto se realizó una electroforesis similar a la ya expuesta, con muestras de músculo canino y control de diferentes pesos moleculares. Finalizada la separación electroforética, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Amersham LIFE SCIENCE, Amersham International plc., Reino Unido), que fue bloqueada e incubada con los anticuerpos anti-MyHC I y anti-MyHC II. Tras incubación posterior con el anticuerpo anti-IgC de ra-

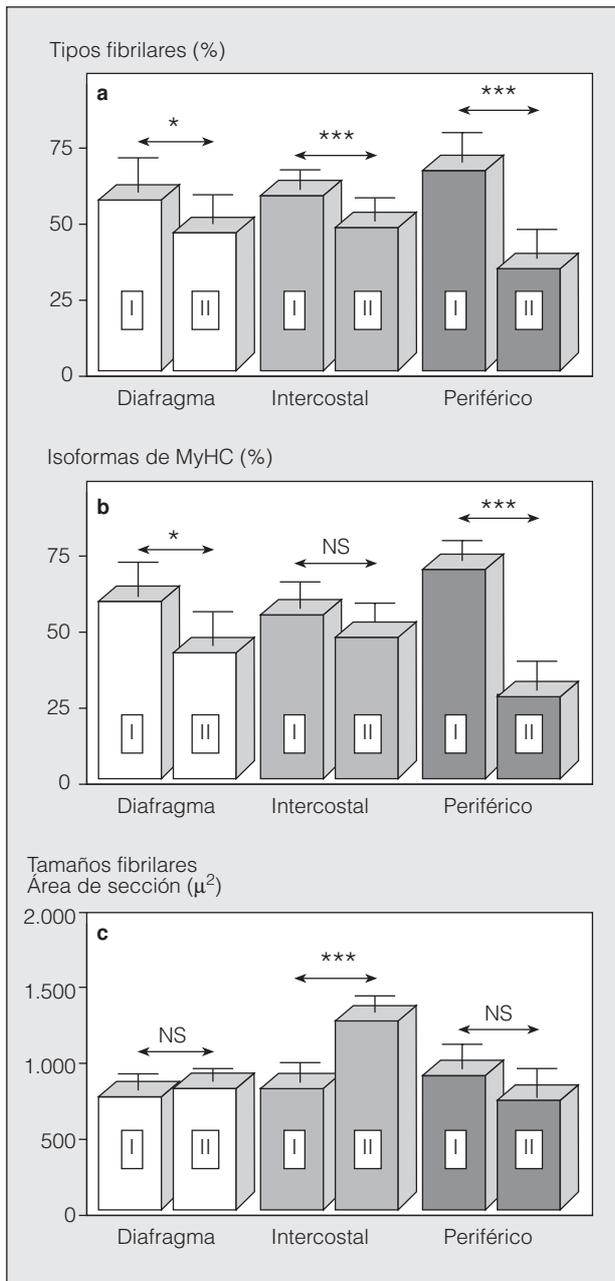


Fig. 1. Comparación entre a) los porcentajes de los tipos fibrilares; b) los porcentajes de las isoformas de MyHC, y c) el tamaño fibrilar para cada músculo. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; NS: no significativo.

tón biotinilado, se lavaron las membranas y se incubaron con el complejo estreptoavidina-peroxidasa. Las membranas se digitalizaron y analizaron con el sistema ya descrito.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (DE) de ésta. Cuando ha sido apropiado, los datos se han expresado en valores porcentuales. Las comparaciones entre isoformas o tipos fibrilares en un mismo músculo, así como entre los diversos músculos para un mismo animal se han realizado mediante un análisis de la variancia para medidas repetidas, habiéndose utilizado el coeficiente de Pearson para evaluar las relaciones entre variables. Se ha asumido como valor de significancia una p ≤ 0,05.

Resultados

Los tamaños y porcentajes fibrilares aparecen representados en la tabla I y la figura 1. Brevemente, las fibras I y II eran de similar tamaño en DFG y PF. Sin embargo, en el IE las de tipo II eran algo mayores que las I. Al comparar los diversos músculos entre sí esto implicaba que el IE tuviera fibras mayores que DFG y PF. En cuanto a la predominancia celular, ésta era para las fibras lentas y resistentes a la fatiga en todos los músculos estudiados. Sin embargo, la diferencia era mayor en el PF. La proporción de fibras híbridas era minoritaria y similar en los tres músculos.

Respecto de las isoformas de MyHC, la inmunodetección permitió confirmar la buena reactividad de los anticuerpos utilizados con las proteínas caninas, así como su especificidad para cada isoforma. Los patrones de migración obtenidos por esta misma técnica eran similares a los reportados en la bibliografía para otros mamíferos (200 kDa para la MYHC I, 204 kDa para la MyHC IIa y 203 kDa para la MyHC IIb). Por otra parte, las proporciones de cada isoforma eran también favorables a la de tipo I (tabla I y fig. 1), aunque la significación estadística sólo pudo observarse en DFG y PF, con una tendencia en el mismo sentido para el IE. Nuevamente, la diferencia entre isoformas era más evidente en el PF. En cuanto a la determinación semicuantitativa absoluta, el PF mostraba más cantidad de MyHC total por unidad de proteínas. Respecto de cada isoforma, el DFG era el que tenía menos MyHC-I por unidad de proteínas. Por último, el daño de membrana era mínimo en los tres músculos, aunque DFG y PF mostraban un nivel algo superior al del IE (tabla I).

TABLA I
Tamaños y proporciones fibrilares, proporciones y cantidad de las diferentes isoformas de MyHC y daño de membrana en los músculos estudiados

	Área fibrilar Global (μ²)	Área fibrilar tipo I (μ²)	Área fibrilar tipo II (μ²)	Fibras tipo I (%)	Fibras tipo II (%)	Fibras híbridas (%)	MyHC I (%)	MyHC total (μg/10 μg prot)	MyHC I (μg/10 μg prot)	Daño (% células)
DFG	840 ± 12 **	819 ± 27 ↑ NS	866 ± 11 **	57 ± 11 ↑ NS	45 ± 12 ↑ NS	2,1 ± 3,8 ↑ NS	59 ± 15 ↑ NS	2,3 ± 0,8 ↑ NS	0,8 ± 0,1 ↑ **	1,3 ± 2,0 ↑ *
IE	1.052 ± 17 *	866 ± 21 NS	1.327 ± 18 ***	58 ± 5 **	43 ± 6 **	1,4 ± 2,1 NS	55 ± 10 **	2,9 ± 0,5 * NS	1,3 ± 0,6 **	0,2 ± 0,6 NS
PF	876 ± 17 ↓	929 ± 21 ↓	784 ± 23 ↓	70 ± 8 ↓	34 ± 7 ↓	3,8 ± 6,1 ↓	72 ± 11 ↓	3,5 ± 1,0 ↓	1,8 ± 0,8 ↓	1,3 ± 1,5 ↓

DFG: diafragma; IE: intercostal externo; PF: periférico (vastus lateralis); *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; NS: no significativo.

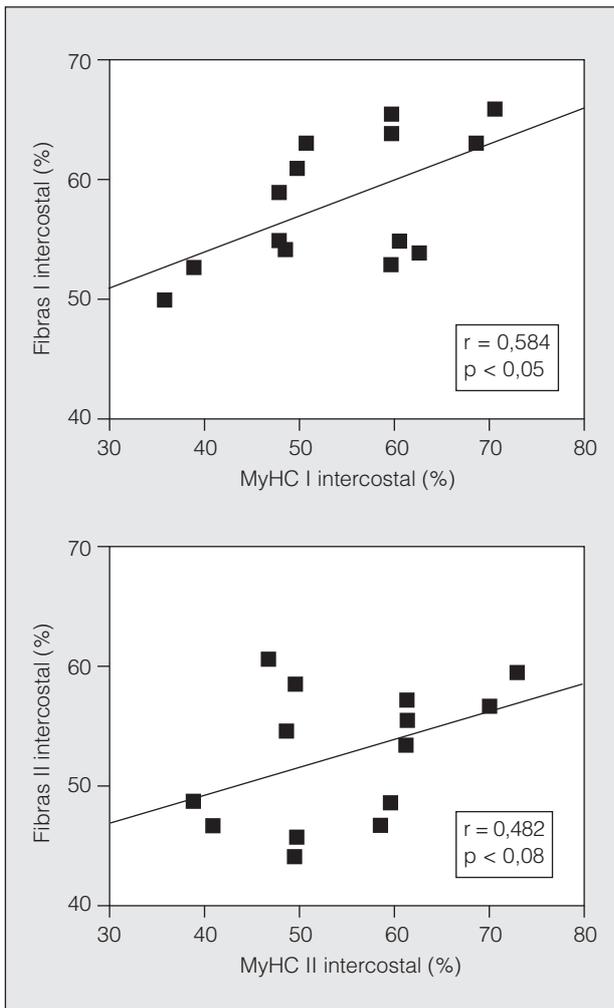


Fig. 2. Relaciones entre los porcentajes fibrilares y de la isoforma correspondiente de MyHC en el músculo intercostal externo.

Entre las correlaciones de interés para las variables obtenidas en un mismo músculo cabe destacar las de cantidad de MyHC-1 y el tamaño de las fibras homónimas, observable tanto en DFG ($r = 0,873$; $p < 0,01$) como en IE ($r = 0,701$; $p < 0,01$). También existía una correlación aceptable entre los porcentajes de cada isoforma de MyHC y los de sus fibras homónimas (p.ej., en el IE, para las I, $r = 0,584$; $p < 0,05$, y para las II, $r = 0,482$; $p = 0,08$) (fig. 2). Finalmente, tanto IE como PF mostraban tendencia a tener tamaños fibrilares proporcionales para las tipo I y las tipo II (respectivamente, $r = 0,680$, $p < 0,01$, y $r = 0,482$; $p = 0,08$) (fig. 3). Esta condición no se cumplía en el DFG.

Respecto de cada variable estructural entre los tres músculos, destacaba que la cantidad de MyHC I era directamente proporcional en ambos músculos respiratorios ($r = 0,700$; $p < 0,05$), sin relación con la del PF. El porcentaje tanto de fibras I como de MyHC I era proporcional entre DFG y PF (fibras I, $r = 0,558$; $p < 0,05$; MyHC I, $r = 0,492$; $p = 0,08$), pero no con el IE, mientras que el número de fibras híbridas era también proporcional en IE y PF ($0,541$; $p < 0,05$).

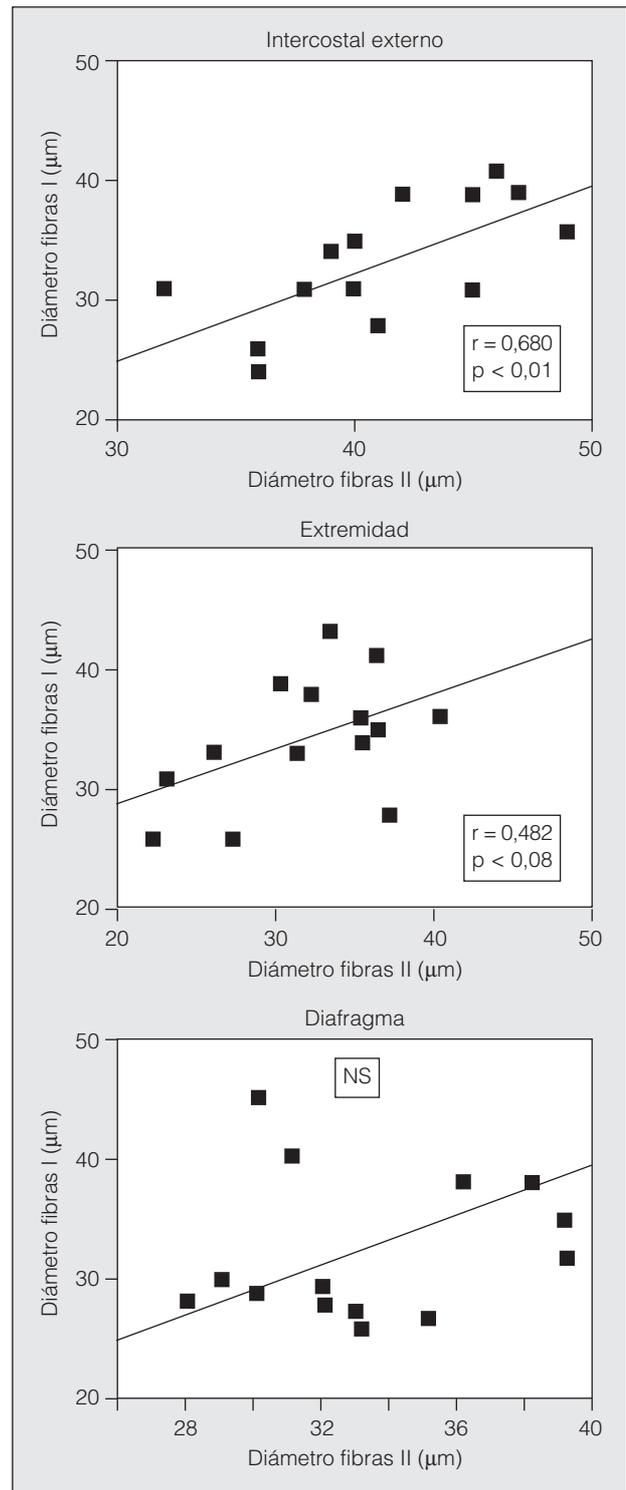


Fig. 3. Relaciones entre los tamaños de las fibras I y II para cada músculo estudiado.

Discusión

Este trabajo proporciona valores estructurales básicos de los dos músculos inspiratorios más importantes y de un músculo periférico en los perros de raza beagle. Dada la falta de datos al respecto y el marco legal actual,

los resultados aquí expuestos pueden ser de utilidad para los investigadores que deseen utilizar un modelo canino en estudios de fisiología muscular respiratoria o ejercicio. En este sentido, los perros se han utilizado tradicionalmente en estudios de fisiología y fisiopatología respiratorias, dadas las similitudes de su mecánica con la de los seres humanos, su resistencia y facilidad de instrumentalización. Sin embargo, en la actualidad, la legislación comunitaria y parte de la española restringen la utilización de perros con fines experimentales a unas pocas razas, entre las que el beagle es la más utilizada. En cuanto a los resultados concretos del estudio, destaca el predominio de fibras y proteínas de contracción lenta y gran resistencia a la fatiga observado en todos los músculos analizados. Además, los tamaños fibrilares son algo mayores en el IE que en DFG y PF.

Utilidad general

Los resultados de este estudio pueden ser utilizados como valores de referencia, reduciendo los costes e implicaciones éticas del uso de un grupo control en otros trabajos. Además, pueden permitir obviar en algunos casos la toma de muestras preintervención (p.ej., actuación con fármacos o entrenamiento) en estudios longitudinales. Esto evita la morbilidad derivada del procedimiento, así como la interferencia de éste (p.ej., liberación de mediadores inflamatorios) con los resultados finales. Por otra parte, conocer las características básicas de esta especie puede permitir un mejor diseño de aquellos estudios que impliquen entrenamiento muscular o respiración bajo cargas. Así, los trabajos encaminados a analizar cambios tras entrenamientos de resistencia (sobre todo para músculos de las extremidades) parecen *a priori* poco razonables en esta raza canina, ya que el margen de cambio es muy pequeño por el absoluto predominio inicial de fibras con esa característica.

Tamaño y tipos fibrilares, daño de membrana

Uno de los datos de más interés es la observación de áreas de sección más amplia en las fibras del IE. Además, ese tamaño mayor es a expensas de las fibras de contracción rápida, por otra parte minoritarias. Estos resultados parecen encajar perfectamente con el papel desempeñado por el músculo IE en la respiración del perro^{4,11-14}, que es semejante en diversos aspectos al que desempeña en humanos¹⁵. El IE participa activamente en la respiración, sobre todo cuando se produce un incremento temporal de cargas, como sucede en el ejercicio o la obstrucción al flujo aéreo. En esas situaciones, este músculo aportaría al sistema fuerza adicional y velocidad de contracción¹⁶. Éstas son precisamente las propiedades que se corresponden con un incremento en el tamaño de las fibras de tipo II.

Por otro lado, se ha observado que las fibras de metabolismo fundamentalmente aerobio y resistentes a la fatiga son predominantes en los dos músculos respiratorios estudiados, pero también en el PF. Respecto a los primeros, esa propiedad no es sustancialmente diferente de lo observado en otras especies^{17,18}, y probablemente

responde a la necesidad de mantener funcionando de forma intermitente y de por vida estos músculos. Respecto del músculo PF, parece corresponderse a las características para las que la raza beagle fue seleccionada: la caza de animales de pequeño tamaño en campo abierto. Cabe comentar aquí que probablemente ese dato no hace del beagle el mejor animal para estudios que intenten reproducir la situación que se vive en las enfermedades pulmonares. Los músculos de un paciente con EPOC o con asma bronquial grave, o los de simplemente un sujeto normal, no son parecidos a los de esta raza canina, que remeda más lo que cabría esperar en un corredor de maratón¹⁹. En todo caso, los eventuales modelos deberían tener en cuenta este factor.

Por último, la escasa proporción de fibras híbridas y de fibras con el sarcolema dañado indican que se trata de animales en buen estado físico, que no se hallan sometidos a agentes externos o internos que puedan inducir lesión o remodelado anómalo de sus músculos esqueléticos.

Cantidad y proporción de proteínas estructurales

Los datos más relevantes son coherentes con los observados a escala celular, y hacen referencia a la mayor expresión de proteínas de contracción lenta y resistentes a la fatiga. En realidad, el predominio de una u otra isoformas de MyHC es lo que confiere a la fibra sus características funcionales²⁰. Por tanto, era de esperar que una mayor proporción de fibras tipo I se explicara por un mayor porcentaje de la isoforma homónima, MyHC-I. Es interesante destacar también que en términos absolutos, las MyHC (exponente del "peso" de las proteínas estructurales fundamentales) eran una parte importante de las proteínas totales del músculo, sobre todo en el PF. Nuevamente, esto es lo que cabe esperar de animales sanos y en buen estado físico. Por otra parte, la MyHC I se expresaba de forma directamente proporcional en DFG e IE, lo que parece apoyar una convergencia fenotípica en algunos aspectos moleculares de ambos músculos respiratorios.

En conclusión, las características fenotípicas de los músculos respiratorios y PF estudiados en el perro beagle responden a lo esperable funcionalmente en una raza seleccionada inicialmente para la caza: con mínimos valores de lesión en circunstancias normales, predominio de fibras y proteínas resistentes a la fatiga, y fibras mayores en el IE, un músculo que desempeña un papel relevante en la respiración en perros. Algunas de estas características permiten cuestionarse la bondad de la raza beagle en estudios de adaptación muscular, sobre todo a trabajos de resistencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Faridy EE, Kidd R, Milic-Emili J. Topographical distribution of inspired gas in excised lobes of dogs. *J Appl Physiol* 1967;22:760-6.
2. Newman S, Road J, Bellemare F, Clozel JP, Lavigne CM, Grassino A. Respiratory muscle length measured by sonomicrometry. *J Appl Physiol* 1984;56:753-64.

3. Bates JH, Decramer M, Zin WA, Harf A, Milic-Emili J, Chang HK. Respiratory resistance with histamine challenge by single-breath and forced oscillation methods. *J Appl Physiol* 1986;61: 873-80.
4. Ninane V, Gorini M, Estenne M. Action of intercostal muscles on the lung in dogs. *J Appl Physiol* 1991;70:2388-94.
5. Domino KB, Cheney FW, Eisenstein BL, Hlastala MP. Effect of regional alveolar hypoxia on gas exchange in pulmonary edema. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:340-7.
6. Ley 5/1995 (21 de junio 1995). Protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas. BOE n.º 190, 10/08/1995.
7. Directiva 86/609 CEE. European Convention for the protection of the vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, 24 de noviembre de 1986, ETS 123.
8. Decret 214/1997 (30 de julio 1997). Regulación de la utilización de animales para experimentación y otras finalidades científicas. DOG 2450, 7/08/1997.
9. Decret 164/1998 (8 de julio 1998), de modificación del Decret 214/1997. DOG 2680, 14/07/1998.
10. Encyclopaedia Britannica. London: Encyclopaedia Britannica, Inc., 1994 [disponible en www.britannica.com: beagle dogs].
11. Legrand A, Cappello M, De Troyer A. Response of the inspiratory intercostal muscles to increased inertial loads. *Respir Physiol* 1995;102:17-27.
12. De Troyer A, Legrand A, Wilson TA. Respiratory mechanical advantage of the canine external and internal intercostal muscles. *J Physiol* 1999;518:283-9.
13. Legrand A, De Troyer A. Spatial distribution of external and internal intercostal activity in dogs. *J Physiol* 1999;518:291-300.
14. De Troyer A, Wilson TA. The canine parasternal and external intercostal muscles drive the ribs differently. *J Physiol* 2000;523: 799-806.
15. Wilson TA, Legrand A, Gevenois PA, De Troyer A. Respiratory effects of the external and internal intercostal muscles in humans. *J Physiol* 2001;530:319-30.
16. Gea J. Myosin gene expression in the respiratory muscles. *Eur Respir J* 1997;10:2404-10.
17. Keens TG, Bryan AC, Levison H, Ianuzzo CD. Developmental pattern of muscle fiber types in human ventilatory muscles. *J Appl Physiol* 1978;44:909-13.
18. Gauthier GF, Padykula HA. Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm. *J Cell Biol* 1966;28:333-54.
19. Costill DL, Fink WJ, Pollock ML. Muscle fiber composition and enzyme activities of elite distance runners. *Med Sci Sports* 1976; 8:96-100.
20. Sweeney HL, Kushmerick MJ, Mabuchi K, Sreter FA, Gergely J. Myosin alkali light chain and heavy chain variations correlate with altered shortening velocity of isolated skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 1988;263:9034-9.