

# Morfometría fibrilar del músculo intercostal externo. Comparación entre los lados dominante y no dominante en pacientes con EPOC severa

M.A. Jiménez-Fuentes, J. Gea, O. Pallás, F. Gallego, M.A. Félez y J.M. Broquetas

Servicio de Neumología y Unidad de Investigación Respiratoria y Ambiental. Hospital del Mar-IMIM. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.

Las características generales de la morfometría del músculo intercostal externo (IE) de pacientes con patología respiratoria crónica han sido ampliamente descritas. Por su accesibilidad, este músculo puede ser un modelo ideal en estudios longitudinales utilizando biopsias consecutivas de ambos lados. Sin embargo, se desconoce si existe o no homogeneidad en el fenotipo fibrilar del IE entre el lado dominante (D) y el no dominante (ND). Se han evaluado las posibles diferencias estructurales del IE entre ambos lados en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se incluyeron 8 enfermos ( $63 \pm 7$  años), en los que se evaluaron la función pulmonar, fuerza muscular respiratoria, fuerza muscular general y estado nutricional. También se practicó biopsia del quinto IE de ambos lados. Las muestras fueron procesadas en paralelo para morfometría convencional (tinción de hematoxilina-eosina), valorándose el diámetro mínimo (Dm) y el área fibrilar (Ar) en cortes transversales. La tipificación de las fibras se realizó mediante las tinciones de ATPasa (a pH de 4,2, 4,6 y 9,4) y NADH-TR. El estudio nutricional fue normal en todos los casos. Los sujetos estudiados presentaban una EPOC severa ( $FEV_1 = 27 \pm 7\%$ , ref., límites entre 13 y 38% ref.), con atrapamiento aéreo ( $RV = 163 \pm 36\%$  ref., límites entre 181 y 276% ref.). Ninguno de los pacientes incluidos presentaba insuficiencia respiratoria en reposo ( $PaO_2 72 \pm 7$  mmHg). El estudio de fuerza esquelética periférica mediante dinamometría manual presentó valores muy similares entre ambos lados:  $D = 29 \pm 2$  y  $ND = 28 \pm 3$  dinas (NS). En el estudio morfométrico de las 16 muestras musculares se observaron tamaños fibrilares similares entre los lados D y ND. Respectivamente,  $Dm_D, 47 \pm 10 \mu m$  y  $Ar_D, 2.595 \pm 1.249 \mu m^2$ , frente a  $Dm_{ND}$  y  $Ar_{ND}$  de  $49 \pm 9 \mu m$  y  $2.636 \pm 953 \mu m^2$  (NS en ambos casos). En cuanto a la tipificación fibrilar tampoco se encontraron diferencias significativas entre el IE dominante y el no dominante: tipo  $I_D, 51 \pm 4\%$  y tipo  $II_D, 49 \pm 5\%$  frente a tipo  $I_{ND}, 52 \pm 4\%$  y tipo  $II_{ND}, 48 \pm 4\%$  (NS). Existe homogeneidad morfométrica entre el fenotipo fibrilar del músculo IE del lado dominante y el no dominante en el quinto espacio intercostal. Este hecho y la escasa invasividad de la técnica permiten plantear estudios longitudinales sobre los efectos estructurales que diferentes intervenciones farmacológicas o físicas puedan tener sobre el IE de pacientes con EPOC.

**Palabras clave:** Estructura. Músculos respiratorios. EPOC.

(Arch Bronconeumol 1998; 34: 189-193)

Correspondencia: Dr. J. Gea.  
Servicio de Neumología.  
Hospital del Mar, P.º Maritim, 27.  
08003 Barcelona

Recibido: 28-8-97; aceptado para su publicación: 23-12-97.

Fiber morphometry of the external intercostal muscle. Comparison of dominant and non dominant sides of patients with severe COPD

The general morphometric characteristics of the external intercostal muscle (EIM) of patients with chronic respiratory disease have been well described. Because this muscle is highly accessible, it can provide an ideal model for longitudinal studies using consecutive biopsies of both sides. Whether or not the EIM fiber phenotype is homogeneous on dominant (D) and non dominant (ND) sides is unknown, however.

To evaluate possible structural differences in right and left EIM in patients with COPD, eight patients ( $63 \pm 7$  years of age) were enrolled. Lung function, respiratory muscle power, general muscle power and nutritional state were evaluated. Biopsies of the fifth EIM were taken from both sides. Specimens were processed in parallel manner to determine conventional morphometry (hematoxylin-eosin staining), including minimum diameter (Dm) and fiber area (Ar) in cross sections. Fibers were typed by ATPase (at pH 4.2, 4.6 and 9.4) and NADH-TR staining.

Nutrition was normal in all patients. All patients had severe COPD ( $FEV_1 27 \pm 7\%$  of reference, limits 13 to 38% of reference) with air entrapment ( $RV 163 \pm 36\%$  of reference, limits 181 to 276% of reference). None of the patients showed respiratory insufficiency at rest ( $PaO_2 72 \pm 7$  mmHg). Peripheral musculoskeletal power measured by manual dynamometer showed no significant right-left differences:  $D 29 \pm 2$  and  $ND 28 \pm 3$  dynes. Morphometric study of 16 muscle specimens showed no significant differences between fiber size on D and ND sides.  $Dm_D$  was  $47 \pm 10 \mu m$  and  $Ar_D$  was  $2,595 \pm 1,249 \mu m^2$ .  $Dm_{ND}$  was  $49 \pm 9 \mu m$  and  $Ar_{ND}$  was  $2,636 \pm 953 \mu m^2$ . Likewise, no significant differences were found between D and ND fiber types: type  $I_D, 51 \pm 4\%$  and type  $II_D, 49 \pm 5\%$  versus type  $I_{ND}, 52 \pm 4\%$  and type  $II_{ND}, 48 \pm 4\%$ .

EIM on N and ND sides is homogeneous at the fifth intercostal space. This finding, along with the scarcely invasive nature of the technique for collecting specimens leads us to suggest that longitudinal studies might be performed on the structural effects of various pharmacological or physical treatments followed by COPD patients.

**Key words:** Structure. Respiratory muscles. COPD.

## Introducción

La actividad de los músculos respiratorios (MR) genera el gradiente de presión necesario para conseguir la entrada de aire hasta el alveolo<sup>1-3</sup>. En los últimos años

ha crecido el interés por conocer las relaciones entre función respiratoria y estructura de los propios MR, sobre todo en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas<sup>4-7</sup>. Esto ha llevado a proponer diversos modelos de abordaje para la obtención de muestras musculares. Clásicamente, las muestras estudiadas, en su mayoría del diafragma, procedían de necropsias y toracotomía. Estos modelos presentan diversos problemas derivados de los fenómenos de muerte celular (en el modelo necrótico) y/o de la inclusión de enfermos con importante patología asociada. Además, el modelo quirúrgico no permite el estudio de pacientes con afectación funcional grave. Desde hace poco, se ha incorporado la obtención de muestras del diafragma durante la laparotomía alta<sup>8</sup>, lo que ha permitido subsanar el último problema. Sin embargo, en ninguno de los modelos citados es posible realizar estudios longitudinales, con obtención de muestras repetidas que permitan evaluar la evolución de la enfermedad o eventuales intervenciones terapéuticas sobre los MR.

A pesar de que el diafragma es el principal músculo inspiratorio en condiciones normales y en individuos sanos<sup>1-3,9</sup>, el intercostal externo (IE) adopta un papel progresivamente relevante cuando aumentan las resistencias respiratorias (p. ej., en la EPOC) o las demandas ventilatorias (p. ej., durante el ejercicio)<sup>10-13</sup>. Por su accesibilidad, y tras la validación en humanos de un modelo escasamente invasivo de biopsia ambulatoria<sup>14</sup>, el IE podría ser el músculo ideal para estudios morfométricos longitudinales. Sin embargo, los cambios estructurales locales derivados de la práctica de la primera biopsia podrían alterar algunos de los hallazgos estructurales en las sucesivas. Poder disponer de otro músculo con fenotipo celular similar al control sería la solución a este problema. Dado que el nivel anatómico de un intercostal condiciona su grado de participación en la inspiración, la solución no estaría en la evaluación del músculo procedente de otro espacio intercostal, sino del contralateral al mismo nivel. Sin embargo, el uso predominante de la extremidad superior dominante podría determinar diferencias entre las características morfométricas de ambos IE. El objetivo de este trabajo fue valorar si existe o no homogeneidad celular entre los IE del lado dominante y no dominante, como paso previo al diseño de estudios morfológicos longitudinales de este MR en pacientes afectados de enfermedades respiratorias crónicas.

## Material y métodos

### Población

Se incluyeron de forma prospectiva un total de 8 individuos de sexo masculino, diagnosticados de EPOC según los criterios clínicos y funcionales clásicos<sup>15-17</sup>. Todos ellos estaban en fase de estabilidad clínica (al menos 3 meses desde la última descompensación) y eran sujetos sedentarios, con un grado de actividad física similar. Se excluyeron pacientes con deformidades congénitas o adquiridas de la caja torácica, edad superior a 75 años, desnutrición severa (variables biológicas y/o antropométricas), enolismo (superior a 80 g/día), que asociaran patologías neuromusculares o metabólicas, y/o que recibie-

sen tratamiento sistémico continuado con esteroides, antagonistas del calcio o diuréticos. Todos eran controlados de forma ambulatoria en el servicio de neumología de nuestra institución y consintieron por escrito en su participación, tras ser informados del objetivo y posibles complicaciones del estudio.

### Método

#### Estudio funcional

1. *Pruebas funcionales respiratorias convencionales.* Consistieron en la práctica de espirometría forzada, determinación de volúmenes pulmonares estáticos, resistencia de la vía aérea, transferencia de CO y gasometría arterial en reposo. La espirometría se realizó mediante un espirómetro Dataspir 900 (Sibel, Barcelona), según la normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)<sup>18</sup>, y utilizando como referencia los valores obtenidos para la población mediterránea<sup>19</sup>. Los volúmenes pulmonares estáticos y resistencia de la vía aérea se determinaron por pletismografía corporal utilizando el equipo Masterlab (Jaeger, Würzburg, Alemania). La transferencia de CO se obtuvo mediante la técnica de "respiración única", utilizando el mismo equipo. Los valores de referencia empleados fueron también los publicados para la población de nuestra área geográfica<sup>20</sup>. La gasometría arterial se realizó por punción de la arteria radial, tras realizar una prueba de Allen, con el paciente sentado y respirando aire ambiente. La muestra sanguínea fue procesada mediante técnicas polarográficas convencionales (medidor de gases en sangre, ABL 330, Radiometer Copenhagen, Dinamarca) para la determinación del pH, PaO<sub>2</sub> y PaCO<sub>2</sub>.

2. *Fuerza muscular respiratoria.* Se midió la presión estática máxima (PIM). Ésta se determinó en la boca y desde volumen residual mediante un manómetro Sibelmed-163 (Sibel, Barcelona) que incluía una pieza bucal ocluíble. Se consideró la mejor de tres maniobras consecutivas, dos de las cuales debían diferir en menos de un 5%. Los valores de referencia utilizados fueron los de Wilson et al<sup>21</sup>.

3. *Fuerza muscular periférica.* Para el estudio de la fuerza esquelética de las extremidades se practicó dinamometría, utilizando un dinamómetro manual tipo Collin (Herrera, Barcelona). Se determinó la fuerza máxima desarrollada en ambas extremidades superiores (dominante o D y no dominante o ND).

#### Estudio nutricional

Se evaluaron parámetros antropométricos y biológicos. Entre los primeros se determinaron el peso, la talla y el índice de masa corporal (BMI: peso/talla<sup>2</sup>). Los parámetros biológicos se obtuvieron a partir de una muestra sérica. Incluyeron: proteínas totales, albúmina, índice de albúmina/globulinas y tiempo de protrombina.

#### Estudio morfométrico del intercostal externo

1. *Obtención de las muestras.* Las biopsias del IE se realizaron en el quinto espacio intercostal, en la línea medio axilar anterior tanto del lado D como del ND. Primero se procedió a la preparación del campo quirúrgico y anestesia local de la zona mediante la inyección intradérmica de mepivacaína al 2%. Posteriormente, se practicó incisión cutánea y se disecó por planos anatómicos hasta localizar la zona de inserción del IE, obteniéndose la muestra. El corte de las fibras se realizó siempre en paralelo a su orientación anatómica. El tamaño de la muestra osciló entre 0,5 y 1 cm de longitud. Finalmente, se procedió a sutura de la incisión mediante seda quirúrgica.

2. *Procesamiento de las muestras.* Tras ser obtenidas, las muestras se disponían con sus fibras perpendiculares al plano de visión y se dividían en dos porciones: una para microscopía óptica convencional y otra para técnicas histoquímicas.

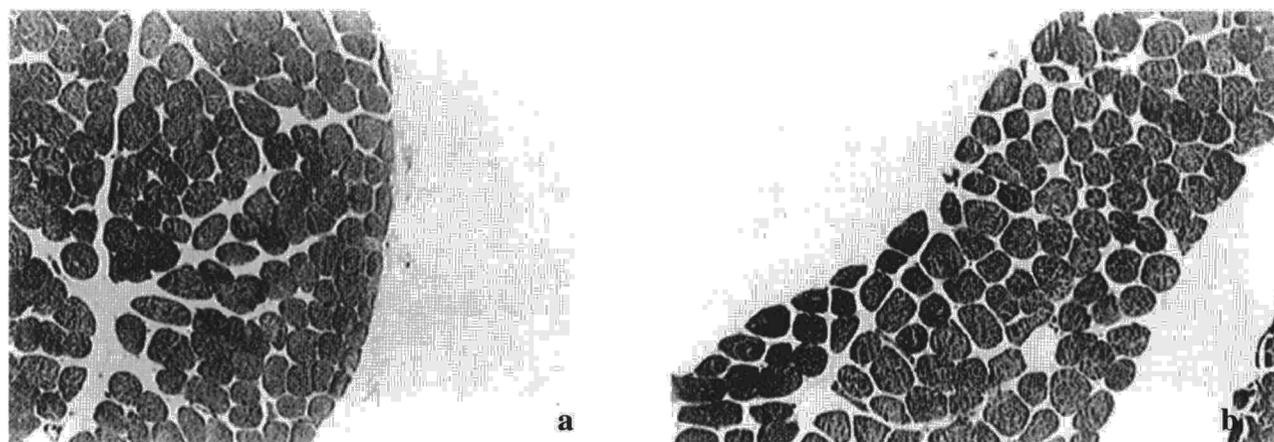


Fig. 1. Corte transversal del músculo intercostal externo (tinción de hematoxilina-eosina) procedente de los lados dominante (a) y no dominante (b) de un mismo paciente. Pueden observarse los tamaños similares de las fibras.

– *Microscopía óptica convencional.* La muestra se fijaba con formaldehído al 10% y era incluida en parafina para realizar posteriormente cortes de 6  $\mu\text{m}$  de grosor. Más tarde se realizaban tinciones de hematoxilina-eosina (HEOS) (fig. 1).

– *Técnicas de histoquímica.* El fragmento muscular se cubría con gel de congelación (Tissue-Tek, O.C.T., Miles, Elkhart, IN, EE.UU.), se congelaba introduciéndolo en isopentano (2-metilbutano, Spectrosol BDH Chemical, Poole, Gran Bretaña) enfriado en nitrógeno líquido, y se almacenaba a  $-70^\circ\text{C}$ . De cada una de las biopsias se realizaron cortes de 6  $\mu\text{m}$  de espesor mediante un criotomo (Cry-cut 2800N Reichert-Jung, Nusslock, Alemania) a temperatura de  $-20^\circ\text{C}$ . Posteriormente se realizaron tinciones de ATPasa, con incubación a diferentes pH (9,4, 4,6 y 4,2) y tinción de NADH-TR (nicotinadenina-deshidrogenasa-tetrazolio-reductasa).

3. *Estudio morfométrico.* Fue realizado mediante el sistema semiautomático Videoplan II (Zeiss, Kontron Electronics, Bremen, Alemania), que dispone de un programa para histomorfometría. El sistema consta de microscopio óptico Polivar 0108 (Reichert-Jung, Viena, Austria), conectado a un sistema digitalizador con lápiz óptico modificado. En cada una de las muestras musculares obtenidas se evaluaron el diámetro mínimo (Dm, que es el diámetro que menos se afecta por la oblicuidad del corte)<sup>22</sup> y la superficie fibrilar (Ar). La morfología de la distribución gráfica de los Dm y el valor de su desviación estándar (DE) fueron utilizados como índices de heterogeneidad en el tamaño de las poblaciones celulares. También

se practicó tipificación fibrilar para el estudio de los porcentajes relativos. En cada muestra se midieron un mínimo de 100 fibras musculares.

#### Tratamiento estadístico

Para la estadística descriptiva se ha utilizado la media y desviación estándar de ésta ( $\bar{X} \pm \text{DE}$ ). Para probar la normalidad de la distribución en cada variable se ha usado la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. En caso de tratarse de variables de distribución normal, las comparaciones se han realizado mediante el test de la t de Student para datos apareados. La prueba de Wilcoxon se ha utilizado para el mismo propósito en variables sin distribución normal. Se consideró significativa una  $p < 0,05$ .

#### Resultados

Los pacientes incluidos mostraban una edad media de  $63 \pm 7$  años, todos ellos eran ex fumadores, con vida sedentaria y afectación severa de la función pulmonar ( $\text{FEV}_1 = 27 \pm 7\%$  ref., límites entre 13 y 38% ref.;  $\text{RV} = 163 \pm 36\%$  ref., límites entre 181 y 276% ref.). Ninguno de los sujetos estudiados se encontraba en fase de insuficiencia respiratoria crónica ( $\text{PaO}_2 = 72 \pm 7$  mmHg,  $\text{PaCO}_2 = 42 \pm 7$  mmHg). El estudio de fuerza muscular respiratoria mostró una PIM del  $62 \pm 18\%$  ref. La evaluación de

TABLA I  
Datos individuales y medios correspondientes a las principales variables antropométricas, funcionales y morfométricas de la población estudiada

Paciente	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	FEV <sub>1</sub> (%)	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PIM (%)	Tipo I <sub>D</sub> (%)	Tipo I <sub>ND</sub> (%)	Dm <sub>D</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Dm <sub>ND</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Área <sub>D</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Área <sub>ND</sub> ( $\mu\text{m}$ )
1	22	32	73	51	52	52	37	35	1.591	1.474
2	17	13	68	51	46	46	39	42	1.597	2.008
3	21	27	80	65	44	47	40	41	1.750	1.818
4	22	26	65	56	51	52	42	50	1.836	2.714
5	24	33	85	80	51	54	45	47	2.130	2.426
6	25	38	68	35	56	54	53	60	3.101	3.658
7	21	24	72	66	54	55	47	51	3.749	2.667
8	26	23	67	93	54	57	70	65	5.008	4.325
$\bar{X} \pm \text{DE}$	3	27	72	62	51	52	47	49	2.595	2.636
	3	7	7	18	4	4	10	9	1.249	953

BMI: índice de masa corporal; PIM: presión inspiratoria máxima; D: dominante; ND: no dominante; Dm: diámetro mínimo.

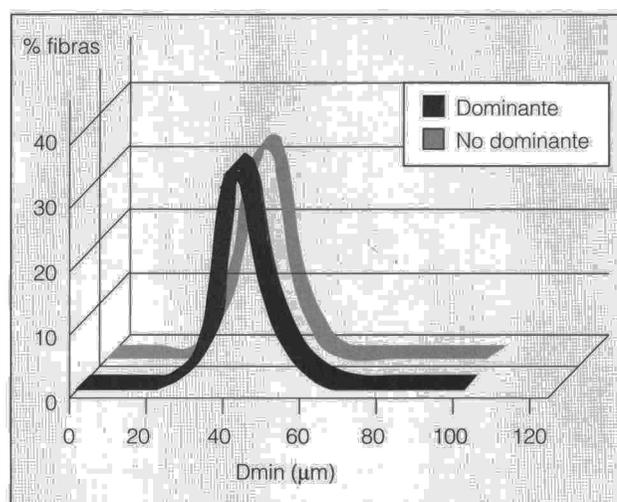


Fig. 2. Distribución unimodal del tamaño de las poblaciones celulares (representado en este caso por el Dmin: diámetro mínimo) en ambos lados y para un mismo paciente.

fuerza general mediante dinamometría manual reveló valores muy similares entre el lado D (derecho en todos menos en uno de los sujetos) y ND (respectivamente,  $29 \pm 2$  y  $28 \pm 3$  dinas). Todos los pacientes presentaban parámetros nutricionales dentro de la normalidad (peso de  $59 \pm 10$  kg, BMI =  $22 \pm 3$  kg/m<sup>2</sup> y proteínas totales de  $6,6 \pm 0,7$  g/dl, con una albúmina de  $3,7 \pm 0,6$  g/dl).

El estudio estructural muscular se realizó sobre las 16 muestras de IE procedentes de los 8 sujetos incluidos (IE<sub>D</sub> e IE<sub>ND</sub> en cada uno de los pacientes). Todas las muestras cumplieron las condiciones necesarias para su estudio morfométrico. La tipificación fibrilar evidenció porcentajes similares de fibras I y II en el IE<sub>D</sub> e IE<sub>ND</sub>: tipo I,  $51 \pm 4$  y  $52 \pm 4\%$ , respectivamente, y tipo II,  $49 \pm 5$  y  $48 \pm 4$  (NS). Los tamaños celulares también fueron similares para ambos lados: DM<sub>D</sub>  $47 \pm 10$  µm, Ar<sub>D</sub>  $2.595 \pm 1.249$  µm<sup>2</sup> y Dm<sub>ND</sub>  $49 \pm 9$  µm<sup>2</sup> y Ar<sub>ND</sub>  $2.636 \pm 953$  µm<sup>2</sup> (NS en ambos). Las distribuciones fueron unimodales aunque anchas en todos los casos (fig. 2), con SDF<sub>D</sub> y SDF<sub>ND</sub> similares ( $7 \pm 2$  frente a  $8 \pm 1$ , respectivamente). En ninguno de los pacientes incluidos en el estudio se objetivaron complicaciones secundarias a la toma de biopsia, presentando una cicatrización normal que permitió la retirada de los puntos de sutura en la semana siguiente de la intervención. Únicamente 2 pacientes requirieron analgesia menor en las 48 h posteriores a la biopsia.

## Discusión

En los últimos años, el estudio de los MR ha puesto de manifiesto relaciones entre su estructura, tanto celular como subcelular, y su función. Algunos de estos trabajos se han dedicado a analizar los cambios que se producen en la musculatura respiratoria de pacientes con patología pulmonar crónica<sup>5-7, 23-27</sup>. Recientemente nuestro grupo ha demostrado alguno de los procesos adaptativos que los MR pueden sufrir en la EPOC. Así, el diafragma presenta atrofia global, pero con desarrollo

de subpoblaciones de fibras hipertroficas en presencia de obstrucción bronquial<sup>5</sup>, y sarcómeras de menor tamaño asociadas al atrapamiento aéreo<sup>6</sup>. En el IE se han descrito fenómenos similares<sup>7</sup>. Descendiendo a nivel molecular, se ha visto que se producen cambios en la expresión genética de los diferentes tipos de miosina en el diafragma de animales sujetos a cargas resistivas sostenidas<sup>26</sup>. Todos estos trabajos son reflejo de un determinado momento en un proceso largo y complejo que se ha denominado "remodelación muscular". Sin embargo, se desconoce la secuencia de hechos que este proceso conlleva en las enfermedades pulmonares. Se ha sugerido que el aumento de trabajo que éstas condicionan induciría daño celular<sup>27</sup>, que se repararía adquiriendo nuevas características (p. ej., en cuanto a las proteínas musculares constitutivas). Esto acabaría desarrollando una composición celular más adaptada a las cargas, lo que permitiría al músculo una mejor respuesta funcional.

El diafragma ha sido el protagonista de la mayoría de estudios que intentan analizar las relaciones entre función respiratoria y estructura de los propios MR. Sin embargo, debido a los problemas derivados de su difícil accesibilidad, ha sido imposible desarrollar estudios longitudinales que analicen los efectos estructurales de la evolución de la propia enfermedad o de eventuales intervenciones terapéuticas. A pesar de la importancia del diafragma entre los MR, otros músculos como los IE adquieren una gran relevancia funcional en situaciones como el ejercicio o el aumento de las resistencias respiratorias<sup>10-14</sup>. Esta contribución parece ser intermitente, siendo estos reclutados cuando se requiere un sobreesfuerzo ventilatorio<sup>10-14</sup>. Recientemente, nuestro grupo ha descrito una técnica sencilla de obtención de muestras del IE, que requiere una invasividad mínima y facilita su realización de forma ambulatoria<sup>14</sup>. Esta técnica permite conseguir muestras de pacientes con afectación funcional severa y, además, repetir una nueva biopsia. Si ésta se realiza en el mismo músculo IE, ciertas variables estructurales de la segunda muestra podrían verse afectadas por la manipulación inherente a la primera biopsia. Esto es de especial interés en estudios sobre daño celular y cambios en la expresión genética de los diferentes componentes fibrilares. Si se optase por modificar el nivel de la biopsia en el mismo hemitórax, los resultados probablemente serían difíciles de interpretar, pues es conocido que la acción inspiratoria depende de la altura del intercostal (siendo progresivamente más importante en los superiores). Además, a niveles más altos existe el problema de tener que diseccionar otros planos musculares, con lo que la técnica aumenta su invasividad. La tercera alternativa era el estudio del músculo contralateral. Sin embargo, una condición previa al desarrollo de este modelo para estudios longitudinales era demostrar que la expresión celular es similar en ambos lados, a pesar de la influencia de los requerimientos de la extremidad superior dominante. Esta eventual influencia puede tener elementos funcionales particulares con EPOC severa, por lo que no era suficiente un trabajo sobre sujetos sanos.

En este estudio se confirma que la biopsia del IE es una técnica segura, sin apenas morbilidad, que hace po-

sible acceder a este músculo respiratorio en pacientes con afectación funcional grave. Más importante y novedoso es el hecho de que no se hayan observado diferencias fenotípicas histológicas entre el lado dominante y el no dominante, lo cual permite disponer de una especie de "músculo control". Es interesante señalar que la relativamente alta desviación estándar observada en los tamaños fibrilares es habitual en los pacientes con EPOC, y en casos extremos permite observar una bimodalidad en las distribuciones<sup>5,7</sup>. Por otra parte, el estudio de al menos 100 fibras en cada muestra permite una correcta representación de la población total aun cuando ésta sea dispersa. El similar fenotipo observado en el presente estudio, independientemente del lado analizado, permite plantear estudios longitudinales. Así, se podrá evaluar la progresión de los cambios estructurales que se producen por la evolución de la propia enfermedad y tras intervenciones físicas o farmacológicas de pacientes con patologías respiratorias crónicas.

### Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a Ángela Roig y a Nuria Soler por su colaboración en la filiación funcional respiratoria y en la realización de las biopsias musculares.

### BIBLIOGRAFÍA

1. De Troyer A, Estenne M. Anatomy of the respiratory muscles. *Clin Chest Med* 1988; 9: 175-194.
2. Orts-Llorca D. Músculos del tórax como factores activos. En: Orts-Llorca D, editor. *Anatomía humana*. Barcelona: Editorial Científico Médica, 1970; 588-594.
3. Celli BR. Respiratory muscle function. *Clin Chest Med* 1986; 7: 567-587.
4. Rochester DF. Respiratory muscle: structure, size and adaptive capacity. En: Jones NL, Killian KJ, editores. *Breathlessness, The Campbell Symposium*. Boston: Springler-Verlang, 1992; 2-12.
5. Sauleda J, Gea J, Orozco-Levi M, Corominas J, Minguella J, Aguar MC. Structure and function relationships of the respiratory muscles. *Eur Resp J* 1998 (en prensa).
6. Orozco-Levi M, Gea J, Aguar MC et al. Ultrastructural changes in the diaphragm of COPD patients: sarcomere adaptability. *Am J Resp Crit Care Med* 1995; 151 (Supl): A 806.
7. Aguar MC, Gea J, Orozco-Levi M, Pastó M, Minguella J, Corominas J et al. Structural changes and function of intercostal muscles in COPD patients. An outpatient mode of biopsy. *Am J Resp Crit Care Med* 1995; 151 (Supl): 806.
8. Minguella J, Pastó M, Gea J, Gallego F, Félez MA, Broquetas JM. Vía transabdominal, un nuevo modelo para la obtención "in vivo" de muestras musculares del diafragma humano. *Arch Bronconeumol* 1997; 33 (Supl): 25.
9. Rochester DF. The diaphragm contractile properties and fatigue. *J Clin Invest* 1985; 75: 1.397-1.402.
10. Buzinska K, Supinski G, DiMarco AF. Inspiratory action of separate external and paraesternal intercostal muscle contraction. *J Appl Physiol* 1989; 67: 1.395-1.400.
11. De Troyer A, Estenne M, Ninane V. Rib cage mechanics in simulated diaphragmatic paralysis. *Am Rev Resp Dis* 1985; 87: 899-910.
12. De Troyer A, Farkas GA. Linkage between paraesternals and external intercostals during resting breathing. *J Appl Physiol* 1990; 69: 509-516.
13. Farkas GA, Decramer M, Rochester DF, De Troyer A. Contractile properties of intercostal muscles and their functional significance. *J Appl Physiol* 1985; 59: 528-533.
14. Aguar MC. Estructura y función de los músculos respiratorios en la EPOC: desarrollo de un modelo de biopsia ambulatoria [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, 1995.
15. Celli BR, Gordon LS, Heffner J, Tiej B, Ziment I, Make B, Braman S, Olsen G, Phillips Y. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 1995; 152: S77-S120.
16. Siafaka NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P et al. ERS consensus statement optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur Resp J* 1995; 8: 1.398-1.420.
17. Montemayor T, Alfajeme I, Escudero C, Morera J, Sánchez-Agudo L. Normativa sobre diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol* 1996; 32: 285-301.
18. Sociedad Española de Patología Respiratoria (SEPAR). Normativa para la espirometría forzada. Barcelona: Ed. Doyma, 1985.
19. Roca J, Sanchís J, Agustí-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisín R. Spirometric reference values for a mediterranean population. *Bull Physiopathol Resp* 1986; 22: 217-224.
20. Roca J, Segarra F, Rodríguez-Roisín R et al. Static lung volumes and single-breath diffusing capacity reference values from a Latin population. *Am Rev Resp Dis* 1990; 141: 1.026-1.032.
21. Wilson SH, Cooke NT, Edwards RH et al. Predicted normal values for maximal respiratory pressures in Caucasian adults and children. *Thorax* 1984; 39: 535-538.
22. Dubowitz V, Brooke MH. Muscle biopsy: a modern approach. En: Dubowitz V, Brooke MH, editores. *Major problems in neurology*. Londres: W.B. Saunders, 1973; 297-326.
23. Hards JM, Reid WD, Pardy RL, Paré RD. Respiratory muscle morphometry: correlation with pulmonary function and nutrition. *Chest* 1990; 97: 1.037-1.044.
24. Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta J, Aguar MC, Serrano S, Broquetas JM. Mitochondria in the human diaphragm and pulmonary function. *Am J Resp Crit Care Med* 1994; 149 (Supl): 325.
25. Gea J. Myosin gene expression in the respiratory muscles. *Eur Respir J* 1997; 10: 2.404-2.410.
26. Gea J, Hamid Q, Comtois N, Salazkin I, Godspink G, Grassino A. mRNA expression of slow heavy chain myosin of diaphragm increases following resistive breathing. *Am J Resp Crit Care Med* 1996; 153 (Sup): 293.
27. Zhu E, Petrof B, Gea J, Comtois N, Grassino A. Diaphragm muscle fiber after inspiratory resistive breathing. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 155: 1.110-1.116.