

Homogeneidad celular en las diversas porciones del diafragma

M.A. Jiménez-Fuentes, J. Gea, M. Mariñán^a, J.B. Gáldiz^a, F. Gallego y J.M. Broquetas

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

^aServicio de Neumología y Cirugía Torácica. Hospital de Cruces. Bilbao.

El diafragma es el principal músculo inspiratorio. Está formado por dos porciones (costal y crural) que presentan diferencias tanto anatómicas como funcionales. Las características morfométricas generales del diafragma se han descrito en diversas especies, pero no se ha estudiado adecuadamente su homogeneidad a lo largo del músculo. El objetivo de este estudio fue evaluar el fenotipo fibrilar de las diversas porciones del diafragma.

Se realizó la exéresis de todo el músculo del diafragma en cinco conejos Nueva Zelanda. El diafragma fue posteriormente fraccionado en sus cuadrantes. Las muestras fueron procesadas para morfometría (tinciones de hematoxilina-eosina, NADH-TR y ATPasa a pH de 4,2, 4,6 y 9,4), valorándose en cada porción los porcentajes y tamaño de las fibras, expresado este último por su diámetro mínimo (Dm), área medida (Ar) y área calculada (Ac).

Los animales mostraron un porcentaje de fibras y tamaño de éstas similar entre los hemidiafragmas derecho e izquierdo (20 porciones evaluadas); respectivamente, 50 ± 2 y $51 \pm 4\%$ de fibras tipo I, Dm tipo I de 38 ± 5 y $41 \pm 4 \mu\text{m}$, Ar tipo I de 1.798 ± 481 y $2.030 \pm 390 \mu\text{m}^2$, Ac tipo I 1.182 ± 360 y $1.321 \pm 382 \mu\text{m}^2$; Dm tipo II de 46 ± 4 y $46 \pm 5 \mu\text{m}$, Ar tipo II $2.466 \pm 388 \mu\text{m}^2$ y $2.539 \pm 456 \mu\text{m}^2$, Ac tipo II 1.642 ± 255 y $1.655 \pm 382 \mu\text{m}^2$. Tampoco se observaron diferencias entre las porciones costal y crural del músculo ($n = 20$); respectivamente, 50 ± 3 y $50 \pm 2\%$ tipo I, Dm tipo I 39 ± 5 y $40 \pm 4 \mu\text{m}$, Ar tipo I 1.857 ± 521 y $1.964 \pm 365 \mu\text{m}^2$, Ac tipo I 1.231 ± 317 y $1.266 \pm 288 \mu\text{m}^2$; Dm tipo II 47 ± 4 y $44 \pm 3 \mu\text{m}$, Ar tipo II 2.563 ± 481 y $2.430 \pm 331 \mu\text{m}^2$, Ac tipo II 1.729 ± 373 y $1.557 \pm 212 \mu\text{m}^2$. Sin embargo, las fibras tipo II eran algo mayores que las tipo I en todas las porciones ($p = 0,001$).

El diafragma de conejo Nueva Zelanda muestra proporciones similares entre sus fibras de contracción lenta y rápida. Su tamaño no difiere del observado en otras especies de mamíferos de tamaño similar. Tampoco difiere para cada tipo de fibra a lo largo del músculo, aunque las tipo II son mayores que las de tipo I en todas las porciones. Así, las características morfométricas son homogéneas a lo largo del diafragma, lo que sugiere una respuesta homogénea del músculo frente a las cargas habituales y además permite plantearse estudios morfométricos longitudinales, utilizando esta especie animal como modelo.

Palabras clave: Diafragma. Fibras. Homogeneidad.

(Arch Bronconeumol 1998; 34: 82-86)

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

Recibido: 26-5-97; aceptado para su publicación: 7-10-97.

Cell homogeneity in diverse portions of the diaphragm

The diaphragm is the main inspiratory muscle. It is composed of two parts, the costal and crural, with both anatomical and functional differences. The general morphometric characteristics of the diaphragm have been described in various species but homogeneity throughout the muscle has not been adequately studied. The aim of this study was to evaluate the fiber phenotype of various parts of the diaphragm.

The entire diaphragm muscles of five New Zealand rabbits were removed and each was divided into quarters. The specimens were processed for morphometry (hematoxylin-eosin stains, NADH-TR and ATPase at pH levels of 4.2, 4.6 and 9.4). For each portion we measured percent and size of fibers, expressing the latter as minimum diameter (Dm), measured area (Ar) and calculated area (Ac).

Left and right diaphragm hemispheres (20 portions examined) were similar for fiber percentages and sizes. For left and right halves, respectively 50 ± 2 and $51 \pm 4\%$ of fibers were type I; type I Dm measurements were 38 ± 5 and $41 \pm 4 \mu\text{m}$; type I Ar values were 1798 ± 481 and $2030 \pm 390 \mu\text{m}^2$; type I Ac values were 1181 ± 360 and $1321 \pm 382 \mu\text{m}^2$; type II Dm values were 46 ± 4 and $46 \pm 5 \mu\text{m}$; type II Ar values were $2466 \pm 388 \mu\text{m}^2$ and $2539 \pm 456 \mu\text{m}^2$; type II Ac data were 1642 ± 255 and $1655 \pm 382 \mu\text{m}^2$. We likewise found no differences between costal and crural portions of the muscle ($n = 20$). For costal and crural portions, respectively, 50 ± 3 and $50 \pm 2\%$ of fibers were type I; type I Dm sizes were 39 ± 5 and $40 \pm 4 \mu\text{m}$; type I Ar measurements were 1859 ± 521 and $1964 \pm 365 \mu\text{m}^2$; type I Ac figures were 1231 ± 317 and $1266 \pm 288 \mu\text{m}^2$; type II Dm were 47 ± 4 and $44 \pm 3 \mu\text{m}$; type II Ar were 2563 ± 481 and $2430 \pm 331 \mu\text{m}^2$; type II Ac were 1729 ± 373 and $1557 \pm 212 \mu\text{m}^2$. Type II fibers, however, were somewhat larger than type I fibers in all portions ($p = 0.001$).

New Zealand rabbit diaphragm muscle has similar percentages of slow and rapid contraction fibers. The size is not different from that observed in other species of mammals of similar size. Fiber type proportions are similar throughout the muscle, with more type II fibers present in all areas. The morphometric characters, therefore, suggest an homogeneous throughout the diaphragm, suggesting homogeneous response of the muscle to usual loads, and also suggesting the possibility of proposing longitudinal morphometric studies using this species as a model.

Key words: Diaphragm. Fibras. Homogeneity.

Introducción

Los músculos respiratorios (MR) son los responsables de generar el gradiente de presión necesario para conseguir la entrada de aire desde el exterior a las unidades alveolares^{1,2}. Dependiendo de la fase respiratoria donde intervengan predominantemente, los MR se dividirán en inspiratorios y espiratorios^{3,4}. El principal músculo inspiratorio en reposo y en sujetos sanos es el diafragma^{5,6}. El diafragma representa el plano de separación entre la caja torácica y la cavidad abdominal. Está compuesto por dos porciones diferenciadas anatómica y funcionalmente: costal (DCs) y crural (DCr)^{7,8}. El músculo se puede dividir también en dos hemidiafragmas, derecho (D) e izquierdo (I); cada uno puede actuar de forma casi independiente⁷ y su mecánica es ligeramente diferente debido a la distinta configuración de las vísceras abdominales. Durante la contracción se produce el desplazamiento inferior de la cúpula diafragmática, generándose así el gradiente de presión que posibilita la entrada de aire. La porción costal tendría una función preponderante de émbolo, mientras que el DCr sería más posicional, actuando como estabilizador de las diferentes estructuras anatómicas.

Como otros músculos esqueléticos, el diafragma está compuesto por tres tipos de fibras (I, IIa y IIb). Así, en el diafragma de gatos adultos se observa aproximadamente un 80% de fibras resistentes a la fatiga (un 55% de tipo I y un 25% de tipo IIa), comparado con el 40% en los músculos de las extremidades⁹. Las características morfométricas del diafragma han sido ampliamente descritas en diversas especies animales⁹⁻¹³ incluyendo el ser humano^{5,6,14,15}. Pero hasta el momento pocos estudios han evaluado la homogeneidad¹⁶ celular a lo largo del músculo y ninguno lo ha hecho entre las porciones costal y crural.

El objetivo de nuestro trabajo ha sido describir las características morfométricas del músculo diafragma a lo largo de sus diversas porciones. Para ello se ha utilizado un modelo animal de conejo Nueva Zelanda.

Material y métodos

Material

Se evaluó el diafragma de 5 conejos adultos de raza Nueva Zelanda, de igual sexo (machos), con un peso corporal similar (límites entre 1,750 y 2,750 kg). Con los animales anestesiados y relajados (ketamina 30 mg/kg y tiopental sódico 10 mg/kg) se practicó la exéresis quirúrgica completa de dicho músculo. Inmediatamente después de su obtención se fraccionó en cuatro porciones: diafragma costal derecho (DCsD), diafragma costal izquierdo (DCsI), diafragma crural derecho (DCrD) y diafragma crural izquierdo (DCrI). La investigación se llevó a cabo siguiendo la Directiva Comunitaria 86/609/CEE de 24-9-1986 para investigación animal.

Técnicas

Los fragmentos musculares se colocaron sobre un plano de fijación, con sus fibras orientadas en sentido transversal al plano de visión. Posteriormente se recubrieron con gel convencional de congelación (Tissue-Tek, OCT, Miles, Elkhart, IN,

TABLA I
Valores individuales de algunos de los parámetros morfológicos estudiados

Animal	Hemidiafragma	Costal			Crural		
		I (%)	Dm I	Dm II	I (%)	Dm I	Dm II
#1	Derecho	52	34	34	51	31	42
	Izquierdo	55	34	35	53	38	30
#2	Derecho	49	33	33	49	39	49
	Izquierdo	54	44	44	53	41	45
#3	Derecho	53	43	43	49	42	48
	Izquierdo	46	38	38	47	43	42
#4	Derecho	49	41	45	53	40	46
	Izquierdo	52	42	44	52	NAP	NAP
#5	Derecho	46	33	34	51	44	45
	Izquierdo	49	45	45	48	40	44

Los valores medios agrupados por hemidiafragmas y porciones costal y crural aparecen en el texto. I (%): porcentaje de fibras tipo I; Dm I: diámetro mínimo de las fibras tipo I; Dm II: diámetro mínimo de las fibras tipo II; NAP: muestra no apta para el estudio morfométrico.

EE.UU.), fueron congelados introduciéndolos en una solución de isopentano (2-metilbutano; Spectrosol BDH Chemical, Poole, Gran Bretaña) enfriado en nitrógeno líquido, y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. De cada una de las muestras musculares se obtuvieron cortes de $5\ \mu\text{m}$ de espesor, mediante un criotomo (Cry-cut 2800 N Reichert-Jung, Nusslock, Alemania) y a temperatura de -20°C . Más tarde se procedió a realizar la tinción de hematoxilina-eosina y técnicas de histoquímica enzimática. En concreto las de ATPasa, con incubación a diferentes valores de pH (9,4, 4,6 y 4,2) y la de NADTH (nicotín-adenina deshidrogenasa-tetrazolio-reductasa).

La evaluación morfométrica de las muestras se realizó mediante el sistema semiautomático Videoplan II (Zeiss, Kontron Electronics, Bremen), dotado de un programa para histo-morfometría. El sistema consta además de un microscopio óptico Polivar 0108 (Reichert-Jung, Viena), conectado a un sistema digitalizador con lápiz óptico modificado.

En cada biopsia muscular se evaluaron las siguientes variables estructurales: porcentajes de cada tipo fibrilar, y área fibrilar medida (Ar), diámetro mínimo (Dm, dado que es el diámetro menos afectado por la oblicuidad del corte¹⁶) y área fibrilar calculada (según el Dm) para cada tipo fibrilar. En cada muestra se midieron al menos 100 fibras de cada tipo.

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 t 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

Las 20 porciones de diafragma estudiadas mostraban el típico patrón en mosaico, constituido por los dos tipos clásicos de fibras, sin observarse agrupaciones fibrilares anormales (tabla I).

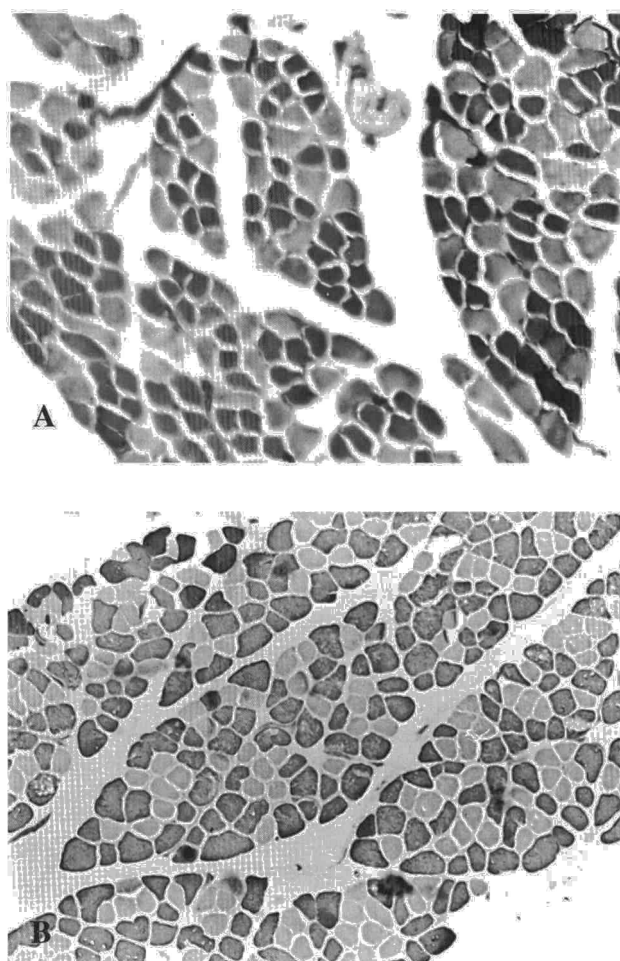


Fig. 1. A: microfotografía correspondiente a la porción costal izquierda del diafragma de conejo Nueva Zelanda ($\times 100$). B: porción crural derecha del mismo animal. Tinción de ATPasa a pH 9,4. Las fibras tipo I aparecen claras; las fibras tipo II, oscuras.

La distribución porcentual para cada tipo de fibras fue similar entre los hemidiafragmas derecho e izquierdo (20 muestras evaluadas): tipo I 50 ± 2 y $51 \pm 4\%$ (no significativo [NS]), tipo II $49 \pm 8\%$ y $48 \pm 6\%$, respectivamente (NS). Así mismo, el tamaño fibrilar tampoco mostró diferencias significativas entre los hemidiafragmas derecho e izquierdo. Para las tipo I: Dm 38 ± 5 y $41 \pm 4 \mu\text{m}$ (NS); Ar 1.798 ± 481 y $12.030 \pm 391 \mu\text{m}^2$ (NS); Ac 1.182 ± 306 y $1.321 \pm 382 \mu\text{m}^2$ (NS). Tipo II: Dm 46 ± 4 y $46 \pm 5 \mu\text{m}$ (NS); Ar 2.466 ± 388 y $2.539 \pm 456 \mu\text{m}^2$ (NS); Ac 1.642 ± 255 y $1.655 \pm 382 \mu\text{m}^2$ (NS).

La porción costal no mostró diferencias respecto a la crural en tipos ni en tamaños fibrilares (20 muestras evaluadas). Para las tipo I: 50 ± 3 y $50 \pm 2\%$ (NS); Dm 39 ± 5 y $40 \pm 4 \mu\text{m}$ (NS); 1.857 ± 521 y $1.964 \pm 365 \mu\text{m}^2$ (NS); Ac 1.231 ± 317 y $1.266 \pm 288 \mu\text{m}^2$ (NS). Para las tipo II: 49 ± 7 y $49 \pm 8\%$ (NS); Dm 47 ± 4 y $44 \pm 3 \mu\text{m}$ (NS); Ar 2.563 ± 481 y $2.430 \pm 331 \mu\text{m}^2$ (NS); Ac 1.729 ± 373 y $1.557 \pm 212 \mu\text{m}^2$ (NS).

Sin embargo, se observó que en todas las porciones estudiadas, las fibras tipo II tenían un tamaño discretamente superior a las de tipo I ($p = 0,001$ en todos los casos).

Discusión

El papel de los MR, y en particular del diafragma, en el desarrollo de insuficiencia ventilatoria es un tema ampliamente estudiado en las últimas décadas^{5,6,18}. Algunos trabajos han evaluado, además, la relación existente entre la función muscular diafragmática y su propia estructura celular y subcelular^{14,15,18,19}. También se han estudiado recientemente los cambios estructurales y ultraestructurales que se producen en los MR de pacientes con EPOC^{14,15,20-25}. Estos estudios estructurales hacen referencia casi siempre a características generales del músculo, prestando poca atención a las posibles diferencias regionales. El hecho de que el diafragma incluya dos músculos diferenciados (costal y crural) desde los puntos de vista embriológico, anatómico y funcional, hace pensar que también puede diferir su fenotipo fibrilar. Además, cada una de estas porciones muestra diferentes relaciones anatómicas en los lados derecho e izquierdo, lo que condiciona una mecánica diferente en algunos aspectos. De hecho, ambos hemidiafragmas actúan de forma independiente, por lo que también cabría esperar diferencias entre ambos lados.

Este trabajo demuestra que a pesar de las diferencias en las cargas que debe soportar cada porción del diafragma, su fenotipo fibrilar es homogéneo en el conejo Nueva Zelanda. Esto tiene importantes implicaciones tanto desde el ámbito teórico como práctico. Por un lado, sabemos que el diafragma, como cualquier músculo esquelético, es capaz de modificar su fenotipo en respuesta al tipo de cargas que debe soportar. Estos cambios, en concreto los tipos y tamaños fibrilares, dependen de modificaciones en la expresión de los genes que modifican sus proteínas estructurales¹⁶. Según se expresen más o menos, y en una u otra dirección, se sintetizarán las isoformas proteicas correspondientes a cada tipo de fibras. Se cree que los estímulos mecánicos que el músculo recibe actúan sobre estructuras nucleares de la fibra, que a su vez determinan cambios en la expresión de sus genes.

Por otra parte, se sabe que cada porción del músculo ejerce funciones algo diferenciadas. Como se ha dicho, la parte costal actúa fundamentalmente como émbolo, mientras que la crural estabiliza las diversas estructuras. En situaciones extremas, la fuerte contracción concéntrica de la porción costal, puede incluso estirar precozmente la porción crural, produciendo una contracción excéntrica. Además, la presencia de la cúpula hepática bajo el hemidiafragma derecho, condiciona algunas diferencias en la mecánica local, derivadas de la longitud del músculo al iniciar la contracción. Sería pues razonable esperar que, a diferentes estímulos mecánicos, correspondieran diferentes fenotipos fibrilares aún en el mismo músculo. Pues bien, esto no parece suceder, al menos para el modelo estudiado. El diafragma muestra

una respuesta homogénea ante las cargas que soportan sus diversas porciones. Esto es cierto, al menos para las cargas habituales en un sistema respiratorio normal, y debiera ser también analizado en modelos animales de enfermedades pulmonares, que implican el aumento de cargas mecánicas y cambios en la configuración del músculo.

Una consecuencia colateral interesante de nuestros resultados es la posibilidad de plantear estudios longitudinales de la estructura del diafragma en el conejo Nueva Zelanda. Para estos estudios, que facilitarían la comprensión de los efectos de las enfermedades respiratorias sobre el músculo, caben dos posibilidades: tomar las diferentes muestras en la misma porción muscular, lo que probablemente sea incorrecto para los cambios que implica la misma acción de la biopsia; o bien, tomar cada muestra en una porción del diafragma. Para esta última opción era necesario probar previamente la homogeneidad en el fenotipo fibrilar.

Hasta la fecha, como se ha mencionado la estructura general del diafragma, ha sido ampliamente descrita en diversas especies animales¹⁰⁻¹³. También se han estudiado las adaptaciones fibrilares secundarias al ejercicio, intervenciones farmacológicas y/o deservación²⁶⁻³². Sorprendentemente son muy pocos los trabajos que han intentado evaluar las diferencias regionales del músculo. En general, el énfasis se ha puesto únicamente en las eventuales diferencias entre sus caras torácica y abdominal¹¹. Únicamente un estudio ha valorado las diferencias regionales tanto en la rata como en el conejo¹¹. Sin embargo, la aproximación al problema se realizó de una forma algo sorprendente, con la división del músculo en porciones “ventral”, “media” y “dorsal”. En este estudio, aunque se observaron algunas diferencias que alcanzaban la significación estadística, éstas fueron mínimas. Recientemente, se ha demostrado que la expresión de los genes que codifican las diferentes isoformas de miosina es similar en los diferentes cuadrantes del diafragma de perro¹⁶. Sin embargo, ese trabajo no valora el fenotipo fibrilar resultante.

Por otra parte, las proporciones de fibras observadas en nuestro trabajo son similares a las descritas previamente por otros autores para el conejo Nueva Zelanda^{30,32}. También lo son los tamaños fibrilares^{11,30,31}, incluyendo un mayor tamaño de las fibras rápidas^{30,31}. Probablemente este último fenómeno responde a las demandas a que se ve sometido el músculo y podría ser útil para generar un suplemento de fuerza en momentos puntuales.

En resumen, las diferentes porciones del diafragma (costal y crural, derecha e izquierda) presentan un patrón celular homogéneo a lo largo del músculo en el conejo Nueva Zelanda. Esto hace pensar que la respuesta del músculo es global, a pesar de los diferentes requerimientos a que está sometida cada una de sus porciones. Esto parece cierto al menos para cargas respiratorias leves, aunque debiera confirmarse para cargas superiores. La homogeneidad del fenotipo celular en el diafragma puede ser de gran utilidad en estudios longitudinales sobre la estructura de este músculo.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a Jesús Martín-Campos, Meritxell Pastó y Mauricio Orozco-Levi por su asesoramiento en el procesamiento de las muestras así como en el estudio morfométrico de éstas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Celli BR. Respiratory muscle function. *Clin Chest Med* 1986; 7: 567-587.
2. De Troyer A, Estenne M. Anatomy of the respiratory muscles. *Clin Chest Med* 1988; 9: 175-194.
3. Orts-Llorca D. Músculos del tórax como factores activos. En: Orts-Llorca D, editor. *Anatomía humana*. Barcelona: Editorial Científico-Médica, 1970; 588-594.
4. Rochester DF. Respiratory muscles: structure, size and adaptive capacity. En: Jones NL, Killian KJ, editores. *Breathlessness, The Campbell Symposium*. Londres: Springer-Verlag, 1992; 2-12.
5. Rochester DF. The diaphragm contractile properties and fatigue. *J Clin Invest* 1985; 75: 1.397-1.402.
6. Rousos Ch, Macklem PT. Diaphragmatic fatigue in man. *J Appl Physiol* 1977; 43: 189-197.
7. De Troyer A, Sampson M, Sigrist S, Macklem PL. The diaphragm: two muscles. *Science* 1981; 213: 237-238.
8. De Troyer A, Sampson M, Sigrist S, Macklem PL. Action of costal and crural part of the diaphragm on the rib cage in the dog. *J Appl Physiol* 1982; 53: 43-46.
9. Steck GC, Roy RR, Powell P, Blanco C, Edgerton UR, Harpen M. Muscle fibres type distribution and architecture of the cat diaphragm. *J Appl Physiol* 1983; 55: 1.386-1.392.
10. Gauthier GF, Padykula HA. Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm. *J Cell Biol* 1966; 28: 333-354.
11. Kilarski W, Sjoström M. Systematic distribution of muscle fibre types in the rat and rabbit diaphragm: a morphometric and ultrastructural analysis. *J Anat* 1990; 168: 13-30.
12. Sandoval JA, Arencibia A, Ramírez G, Montes A. Estudio histoquímico y morfométrico de la población fibrilar del músculo diafragma. Parte II: Vaca y cerdo. *Anat Histol Embryol* 1995; 24: 275-280.
13. Sandoval JA, Gil F, Arencibia A, Ayala I, Vázquez JM. Estudio histoquímico y morfométrico de la población fibrilar del músculo diafragma. Parte I: Caballo y perro. *Anat Histol Embryol* 1995; 24: 269-274.
14. Sauleda J. Correlaciones entre la estructura y la función de los músculos respiratorios [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, 1994.
15. Orozco-Levi M. Cambios adaptativos de las estructuras subcelular del diafragma humano [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, 1995.
16. Gea J, Hamid Q, Comtois N, Salazkin I, Zhu E, Goldspind G. Expression of slow and fast myosin mRNA in canine diaphragm. *Eur Resp J* 1995; 8 (Supl): 88.
17. Dubowitz V, Brooke MH. Muscle biopsy: a modern approach. En: Dubowitz V, Brooke MH, editores. *Major problems in neurology*. Londres: W.B. Saunders, 1973; 74-85.
18. Grassino A, Clanton T. Respiratori muscle fatigue. *Sem Resp Med* 1991; 12: 305-321.
19. 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.
20. Hards JM, Reid WD, Pardy RL, Paré PD. Respiratory muscle morphometry: correlation with pulmonary function and nutrition. *Chest* 1990; 97: 1.037-1.044.
21. Orozco-Levi M, Gea J, Sauleda J, Minguella J, Corominas JM, Broquetas JM. Estructure of the latissimus dorsi muscle during inspiratory threshold loads. *Eur Resp J* 1995; 8: 441-445.
22. 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).
23. 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): 806.

24. Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta J, Aguar MC, Serrano S, Broquetas JM. Mitochondria in the human diaphragm and pulmonary function. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149 (Supl): 325.
25. Gea J, Hamid Q, Comtois N, Salazkin I, Goldspink G, Grassino A. mRNA expression of slow heavy chain myosin of diaphragm increases following resistive breathing. *Am J Resp Crit Care Med* 1996; 153 (Supl): 294.
26. Farkas GA, Rousos C. Adaptability of the diaphragm to exercise and/or emphysema. *J Appl Physiol* 1982; 53: 1.263-1.272.
27. Ferguson GT, Irvin G, Cheniack RM. Effect of corticosteroids on respiratory muscle histopathology. *Am Rev Resp Dis* 1990; 142: 1.047-1.052.
28. Lewis MI, Monn SA, Sieck GC. Effect of corticosteroids on diaphragm fatigue, SDH activity, and muscle fiber size. *J Appl Physiol* 1992; 72: 293-301.
29. Prezant DJ, Chung B, Kim H, Yu A, Karwa ML, Silverman R. Long term beta-2-agonist (clenbuterol) therapy produces diaphragm hypertrophy and dysfunction. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147 (Supl): 959.
30. Jiang TX, Cairns JD, Road JD, Wilcox PG. Effect of the beta-agonist clenbuterol on dexamethasone induced diaphragm dysfunction in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1.778-1.783.
31. Yellin H. Changes in fiber types of the hypertrophying denervated hemidiaphragm. *Exp Neurol* 1974; 42: 412-428.
32. Zhan W, Farkas GA, Schoeder MA, Gosselin LE. Regional adaptation of rabbit diaphragm muscle fibers to unilateral denervation. *J Appl Physiol* 1995; 79: 941-950.
33. Gea J. Myosin gene expression in the respiratory muscles. *Eur Respir J* 1997; 10: 2.404-2.410.