

CALCIO Y CONTRACTILIDAD DIAFRAGMÁTICA. MODIFICACIÓN POR LAS METILXANTINAS

A. De Diego, J. Oron*, M. Perpiñá, J.L. Ortiz*, J. Cortijo* y E. Morcillo.

Servicio de Neumología. Hospital La Fe y

* Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Valencia.

En el presente estudio se han investigado las fuentes de Ca^{2+} utilizadas en la contractilidad diafragmática así como la modificación producida por teofilina (TE) y cafeína (CA) ($5 \times 10^{-5}\text{M}$ a $5 \times 10^{-4}\text{M}$). Para ellos, utilizamos tiras de músculo diafragmático de cobayo (0,5x15 mm) estimulado eléctricamente mediante pulsos simples de 0,2 ms, 1 Hz, aplicados 3 veces por minuto.

La respuesta contráctil o *twitch tension* (TT) evocada por el estímulo eléctrico fue de $84 \pm 7 \text{ mg F}$ ($X \pm \text{EEM}$) y no se modificó en presencia de neostigmina (10^{-5}M), pancuronio (10^{-5}M) o tetrodotoxina (10^{-6} g/ml), descartando así cualquier acción indirecta del estímulo eléctrico sobre la transmisión nerviosa.

Cuando se utilizaron soluciones nutricias sin Ca^{2+} , la contractilidad sólo disminuyó un $19 \pm 3 \%$ y no se modificó en presencia de verapamil 10^{-5} M . Por el contrario, el dantroleno sódico produjo una disminución en la TT del $73 \pm 3 \%$.

El tratamiento con TE y CA produjo incrementos significativos en la TT del $65 \pm 10 \%$ y $105 \pm 13 \%$, respectivamente. Estos incrementos tampoco se vieron modificados en presencia de verapamil 10^{-5} M ó solución libre de Ca^{2+} . Asimismo, TE y CA no sólo no revirtieron los efectos inhibidores del dantroleno sino que potenciaron la TT en un 50 y un 72 %, respectivamente.

Los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental *in vitro* nos indican que: a) la contractilidad diafragmática, al igual que el resto de los músculos esqueléticos, sólo dependen parcialmente del Ca^{2+} extracelular y b) las metilxantinas ejercen un efecto potenciador de la fuerza contráctil diafragmática, no dependiente del Ca^{2+} extracelular y probablemente relacionado con la liberación intracelular del Ca^{2+} .

Arch Bronconeumol 1990; 26:341-345.

Introducción

Los músculos respiratorios, y especialmente el diafragma, tienen la función de generar la presión necesaria para movilizar la caja torácica y obtener así una ventilación adecuada¹. El estudio de su funcionamiento ha adquirido importancia en los últimos años al

Calcium and diaphragmatic contractility. Modification by methylxantines.

In the present study, the sources of Ca^{2+} used in the diaphragmatic contractility and the changes induced by teophylline (TE) and caffeine (CA) ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) were investigated. To this end we used strips of diaphragm muscle from guinea pigs (0,5 x 15 mm), electrically stimulated with simple 0,2 ms, 1 Hz pulses, delivered 3 times per minute.

The contractile response or *twitch tension* (TT) elicited by the electrical stimulus was $84 \pm 7 \text{ mg F}$ ($X \pm \text{SEM}$) and did not change in the presence of neostigmine (10^{-5}M), pancuronium (10^{-5}M) or tetrodotoxin (10^{-6} g/ml). Thus, any indirect action of the electrical stimulus on the nervous transmission was ruled out.

When nutrient solutions free from Ca^{2+} were used, the contractility was only reduced in $19 \pm 3 \%$ and did not change in the presence of verapamil 10^{-5}M . By contrast, sodium dantrolene induced a $73 \pm 3 \%$ reduction in TT.

The treatment with TE and CA induced significant TT increases of $65 \pm 10 \%$ and $105 \pm 13 \%$, respectively. These increases also did not change in the presence of verapamil 10^{-5}M or of Ca^{2+} free solution. Also, TE and CA not only did not reverse the inhibitory effects of dantrolene, but they potentiated TT by 50 % and 72 %, respectively.

The results of our *in vitro* experimental model suggest that: a) Diaphragmatic contractility, as in the other skeletal muscles, only partially depends from extracellular Ca^{2+} , and b) Methylxanthines have a potentiating effect on diaphragmatic contractile force, independent from extracellular Ca^{2+} and probably related to the intracellular release of Ca^{2+} .

observarse que la aparición de insuficiencia respiratoria hipercápnica en los individuos con obstrucción crónica al flujo aéreo (OCFA), viene precedida en algunas ocasiones por alteraciones en su capacidad contráctil².

Tradicionalmente, el tratamiento de estos pacientes se ha dirigido a reducir las cargas mecánicas sobreañadidas, utilizando fármacos broncodilatadores, o bien favoreciendo la eliminación de secreciones. Sin embargo, estas medidas resultan insuficientes en muchas

Recibido el 12-3-1990 y aceptado el 30-5-1990. Trabajo subvencionado con fondos de la beca de ayuda a la investigación SEPAR-Abelló 1987 y el proyecto 88/1950 del FIS/SS.



ocasiones, de ahí que resulte particularmente atractivo el estudio de fármacos capaces de aumentar directamente la contractilidad diafragmática.

En este sentido, diversos trabajos *in vivo*, llevados a cabo tanto en animales de laboratorio³⁻⁵ como en sujetos sanos⁶⁻⁸ o en pacientes con OCFA⁹⁻¹⁰, han demostrado que las metilxantinas aumentan la contractilidad diafragmática y retrasan la aparición de la fatiga muscular respiratoria. Sin embargo, no siempre se ha encontrado este tipo de resultados¹¹⁻¹². Y ello es así probablemente porque las respuestas obtenidas *in vivo* se ven influidas por factores muy diversos y de difícil control (entre otros, configuración toracoabdominal, volumen pulmonar y grado de activación neuronal¹). Por el contrario, en los estudios *in vitro*, donde estos efectos dependen únicamente de las propiedades contractiles de las fibras musculares, todos los autores¹³⁻¹⁵ coinciden en afirmar que las metilxantinas potencian la contractilidad del diafragma.

El mecanismo de acción por el cual estas sustancias producen el efecto ionotrópico positivo todavía no es bien conocido. De entre las diversas hipótesis sugeridas, inhibición de la fosfodiesterasa¹⁶, bloqueo de receptores adenosínicos⁸ ó alteraciones en el trasiego transmembrana de calcio (Ca^{2+}), es ésta última la más comunmente aceptada. Sin embargo, mientras que algunos autores¹⁷⁻²⁰ piensan que las metilxantinas aumentan la fuerza contráctil del diafragma al favorecer el paso de Ca^{2+} extracelular a través de canales voltaje-operados, otros³ plantean mecanismos distintos, similares a los que se dan en el resto de músculos esqueléticos y relacionados con la acción directa de estos fármacos sobre el Ca^{2+} intracelular.

El objetivo del presente trabajo, realizado en un modelo *in vitro*, es doble. Por un lado, aportar información acerca de las fuentes de Ca^{2+} que utiliza el diafragma para generar tensión. Por otro, definir no ya cómo las metilxantinas aumentan esta tensión sino cuál es el origen del Ca^{2+} empleado en esta acción potenciadora.

Material y métodos

Obtención y montaje del preparado biológico:

Cobayos de ambos sexos, con un peso medio de 350-400 g, fueron sacrificados mediante un golpe en la región retrocervical y desangrado rápido posterior.

El diafragma, cuidadosamente disecado a partir de sus inserciones costales, lumbares y xifoideas, se depositó en una placa de Petri con solución nutritiva de Krebs-Henseleit (ClNa: 137 mM, ClK: 4 mM, ClMg: 1 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 1 mM, CO_3HNa : 12 mM, Cl_2Ca : 2 mM, Glucosa: 6.5 mM), burbujeada con carbógeno (95 % O_2 y 5 % CO_2) y mantenida a temperatura ambiente (20°-21°C) y pH: 7,4-7,6.

Inmediatamente después, y mediante el empleo de una lupa binocular, se obtuvieron tiras de diafragma costal de aproximadamente 0,5 mm de grosor y 1,5 cm de longitud. Estas tiras se colocaron en el interior de una copa de baño de órganos, aforada en 10 ml de solución nutritiva, mantenida a 37°C y burbujeada continuamente con carbógeno, donde quedaron sujetas por un extremo distal a un punto fijo (gancho terminal del electrodo) y por otro a un transductor isométrico tipo Hewlett-Packard FTA 100-1, provisto de un tornillo micrométrico de precisión FTA 1011. El transductor se conectó a un registrador modular bicanal Phillips PM-8222, a través de un amplificador Hewlett-Packard 8805B.

La tensión óptima inicial, calculada previamente, fué de 500 mg. Tras un período de estabilización de 30-60 min, la longitud del preparado fué ajustada nuevamente a la longitud a la cual la respuesta contráctil fué máxima.

Generación de fuerza contráctil diafragmática:

Para la producción del estímulo contráctil, se utilizó la estimulación eléctrica de campo mediante dos electrodos de acero inoxidable en forma de anillo, montados sobre una superficie aislante de la varilla metálica y dirigidos perpendicularmente a los dos extremos de la tira de diafragma, procurando en todo momento que no existiera contacto alguno entre el reactivo biológico y los electrodos. Mediante un estimulador Grass S-88, se aplicaron estímulos simples rectangulares, tres por minuto, de 0.2 ms de duración y frecuencia de 1 Hz, siguiendo el modelo descrito por Viires et al¹³. La preparación se sometió a incrementos sucesivos de intensidad de corriente hasta alcanzar el adecuado valor supramaximal en la correlación intensidad-fuerza.

Protocolo experimental:

Aproximadamente 30 min después de conseguir un registro basal estable se procedió a la realización de los siguientes protocolos:

A.) Curvas dosis-respuesta acumulativas a fármacos antagonistas de la transmisión neuromuscular como: i) neostigmina (10^{-7} a 10^{-5} M); ii) pancuronio (10^{-6} a 10^{-4} M) y iii) dosis puntual de tetrodotoxina (TTX) (10^{-6} g/ml).

B.) Curvas dosis-respuesta acumulativas a fármacos antagonistas del Ca^{2+} extracelular (verapamil 10^{-7} a 10^{-4} M) o intracelular (dantroleno sódico 5×10^{-8} a 5×10^{-5} M).

C.) Curvas dosis-respuesta acumulativas a teofilina y cafeína (5×10^{-5} a 5×10^{-4} M) en ausencia y presencia de verapamil (10^{-5} M) y dantroleno sódico (10^{-7} a 10^{-5} M) (tiempo medio de incubación: 20 min)

D.) Curvas dosis-respuesta acumulativas a teofilina y cafeína tras un periodo de 15 min en solución libre de Ca^{2+} .

En las experiencias exentas de Ca^{2+} , se eliminó del líquido nutritivo el Cl_2Ca , añadiéndose además como quelante ácido etilenglicol tetracético (EGTA), en una concentración, 0,1 mM.

Análisis de los resultados:

Las curvas dosis-respuesta obtenidas, se cuantificaron en mg de fuerza (mg F) o en porcentajes sobre la contracción basal para expresar la fuerza de contracción (*twitch tension*) y como logaritmo de la unidad molar para la dosis. Asimismo se determinaron los efectos máximos alcanzados (Emax) y las correspondientes concentraciones del agonista que produjeron un 50 % del efecto máximo y que se expresaron como el logaritmo negativo de la concentración eficaz 50 % (pD_2).

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó aplicando la prueba χ^2 para comparación de proporciones en muestras independientes y la "t" de Student para muestras apareadas o no apareadas según los casos. El nivel de significación fué establecido en 0,05. Todos los resultados se expresaron como $\bar{X} \pm \text{SEM}$.

Los productos utilizados fueron: Cafeína y teofilina, bases anhidridas (Sigma Chemical Company); clorhidrato de verapamil (Knoll Industria); dantroleno sódico (Alonga Lab. Lafarquin SA); bromuro de pancuronio (Organon Española SA) y sulfato de neostigmina (Roche SA).

Resultados

A) Origen del Ca^{2+} en la contractilidad diafragmática: influencia de verapamil, dantroleno sódico o solución libre de Ca^{2+} .

Las contracciones obtenidas en las tiras de diafragma tras su estimulación eléctrica fueron de 84 ± 7 mg F. Estos valores no se modificaron significativamente tras la adición de dosis crecientes de neostigmina o pancuronio, ni en presencia de dosis puntuales de TTX, descartándose de este modo cualquier acción indirecta del estímulo eléctrico sobre la transmisión nerviosa.

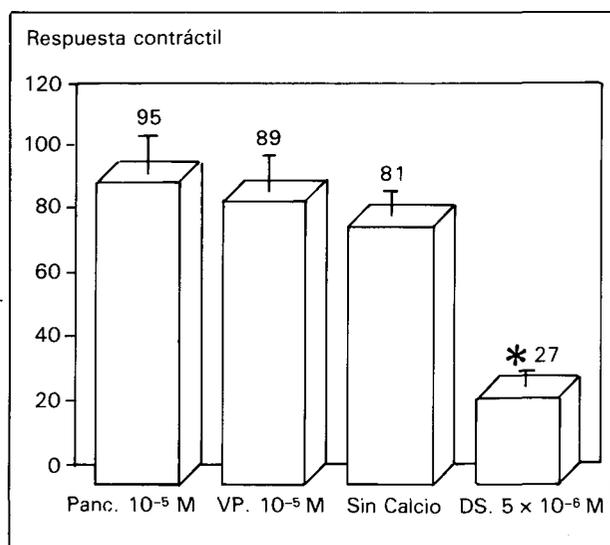


Fig. 1. Efectos de pancuronio (Panc. 10⁻⁵ M), verapamil (VP 10⁻⁵ M), solución libre de Ca²⁺ (SIN CALCIO) o dantroleno sódico (DS 5x10⁻⁶ M) sobre la contractilidad diafragmática (p < 0,05).

TABLA I
Incrementos de fuerza contráctil diafragmática tras el tratamiento con teofilina y cafeína. Modificación por verapamil, dantroleno sódico o solución sin Ca²⁺

	Cafeína		Teofilina	
	E. max	pD ₂	E. max	pD ₂
Control	105,9 ± 13,9	3,73 ± 0,05	65 ± 10	3,65 ± 0,002
VP 10 ⁻⁵ M	106,3 ± 20	3,74 ± 0,06	78 ± 4	3,64 ± 0,03
DSS x 10 ⁻⁶ M	72,9 ± 14,8		50 ± 19	
Sin Ca ²⁺	134,3 ± 9,2	3,73 ± 0,05	54 ± 16	3,07 ± 0,11

E. max: efecto máximo; pD₂: logaritmo negativo de la concentración eficaz 50%; VP: verapamil; DS: dantroleno sódico.

Por otro lado, esta respuesta contráctil sólo disminuyó un 19 ± 3 % cuando la estimulación eléctrica se llevó a cabo en ausencia de Ca²⁺ libre en el medio. El pretratamiento con verapamil, tampoco introdujo modificaciones significativas en las contracciones obtenidas, disminuyendo únicamente un 11 ± 8 %. Sin embargo, la incubación con dantroleno sódico inhibió la respuesta contráctil en un 73 ± 3 % (fig.1)

B) Efectos de las metilxantinas sobre la contractilidad diafragmática: influencia de verapamil, dantroleno sódico ó solución libre de Ca²⁺.

La utilización de dosis crecientes de cafeína y teofilina produjo aumentos significativos, dosis-dependientes, en la contractilidad de las tiras diafragmáticas, con incrementos en sus Emax del 105,9 ± 13,9 % y 65,0 ± 9,7 % respectivamente.

La sensibilidad, expresada mediante sus correspondientes pD₂, fué de 3,73 ± 0,05 y 3,65 ± 0,02, para cafeína y teofilina, respectivamente.

El aumento de la contractilidad obtenido en ambos casos, no se modificó de forma significativa ni en presencia de verapamil ni en solución libre de Ca²⁺ (fig.2)

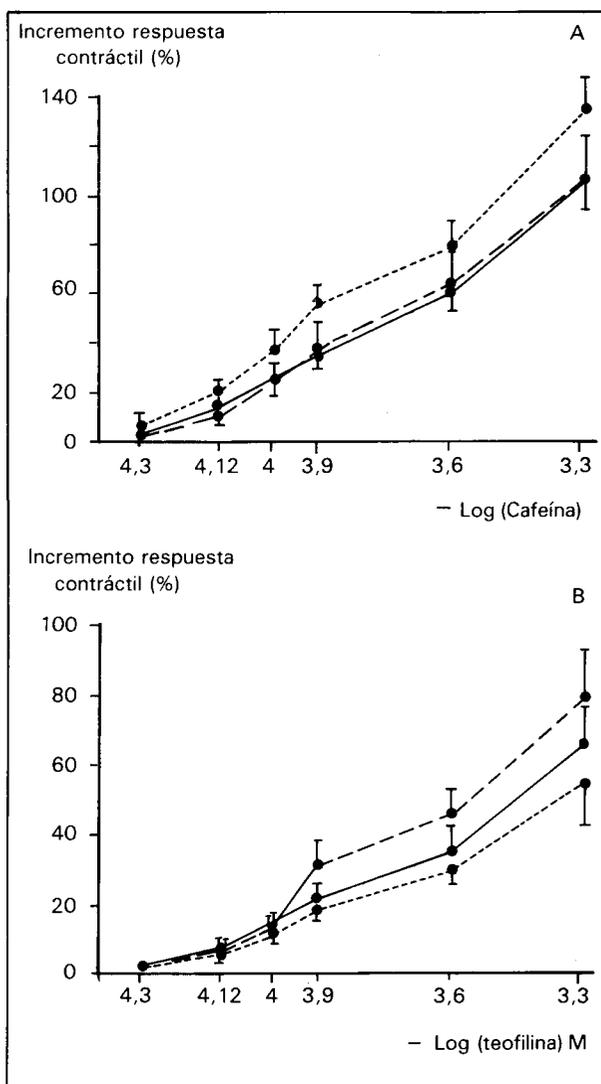


Fig. 2. Curvas dosis-respuesta acumulativas de cafeína (A) y teofilina (B) en ausencia (—) o presencia de verapamil (---) o en solución sin Ca²⁺ (---).

Asimismo, teofilina y cafeína no sólo no revirtieron por completo la inhibición producida por dantroleno sódico en la contractilidad diafragmática, sino que además la incrementaron en un 50 y un 72 %, respectivamente (tabla I)

Discusión

El primer aspecto analizado en nuestro estudio es el origen del Ca²⁺ utilizado en la contracción diafragmática. Como hemos visto, ni la ausencia de Ca²⁺ en el medio, ni el pretratamiento con verapamil, un antagonista del Ca²⁺ extracelular por canales voltaje-operados, modificaron significativamente la fuerza contráctil. Sin embargo, el dantroleno sódico, un relajante muscular que actúa inhibiendo la liberación del Ca²⁺ unido a la membrana interna del túbulo "T", inhibió



casi por completo la respuesta contráctil en nuestros preparados. Esto nos indica por tanto que el estímulo contráctil actúa probablemente liberando el Ca^{2+} unido a la membrana.

Es un hecho conocido que la contracción depende, en última instancia, del aumento del Ca^{2+} intracelular liberado a partir del retículo sarcoplásmico (RS). Sin embargo, está por definir aún a través de que vías tiene lugar la liberación de este Ca^{2+} . Existen al respecto dos teorías: la primera²¹ propugna que es el propio estímulo despolarizador, el que al actuar sobre el RS a través de la membrana de los túbulos "T" liberaría el Ca^{2+} allí ligado; la segunda²², que es la más aceptada para el músculo esquelético, asigna al mismo Ca^{2+} un papel regulador en este punto del acoplamiento excitación-contracción mediante un mecanismo conocido como " Ca^{2+} liberado por Ca^{2+} ". De ser cierta esta última hipótesis, la cuestión a resolver se centraría en el origen de este Ca^{2+} "liberador" utilizado en el proceso contráctil. Mientras que algunos autores²³⁻²⁴ afirman que se trata del propio Ca^{2+} extracelular, que entraría a través de canales voltaje-operados, otros²⁵ opinan que la señal inicial parte de pequeños depósitos de este ión ubicados en la superficie interna de la membrana de los túbulos T, en el espacio comprendido entre éstos y el RS. De esta manera, el Ca^{2+} extracelular intervendría únicamente como elemento mantenedor de este depósito.

El hecho de que en nuestro estudio la fuerza contráctil no se viera modificada por la ausencia de Ca^{2+} extracelular ni por verapamil, mientras que sí disminuyó en presencia de dantroleno sódico, apoya esta última hipótesis. La discrepancia con otros trabajos, en los que se concluye que el diafragma depende directamente del Ca^{2+} extracelular para su contracción, no puede ser atribuida a la metodología utilizada, que es similar, sino a las distintas especies animales utilizadas: rata²³ o perro²⁴ versus cobaya (presente estudio). La variabilidad interespecies en la composición de los tipos de fibras musculares quizás pueda explicar las diferencias observadas²⁶.

El segundo de los aspectos investigados presenta en algunos puntos resultados que son discordantes con lo previamente publicado y nos sugieren que las metilxantinas ejercen su efecto potenciador de la contractilidad, al aumentar la liberación del Ca^{2+} unido al RS por un mecanismo no dependiente del Ca^{2+} extracelular.

Tal y como se ha señalado en nuestro estudio, el tratamiento de las tiras de diafragma con dosis terapéuticas de metilxantinas potenció la fuerza contráctil generada. El mecanismo exacto por el que las metilxantinas aumentan la contractilidad diafragmática no se conoce. Se ha sugerido¹⁶ que su mecanismo principal de actuación es el de aumentar los niveles de AMPc, por inhibición de la fosfodiesterasa; sin embargo, tal como han demostrado otros estudios²⁷, a concentraciones terapéuticas la inhibición producida por estos agentes es mínima.

Para otros autores¹⁷⁻²⁰, el efecto potenciador de la teofilina sería consecuencia del incremento de la en-

trada de Ca^{2+} extracelular por canales voltaje-operados, debido a su acción antiadenosínica. Esta opinión se fundamenta en los siguientes datos: 1) el efecto potenciador de teofilina desaparece en ausencia de Ca^{2+} extracelular ó en presencia de verapamil; 2) la dosis necesaria para producir el efecto inhibitor de la adenosina es sustancialmente menor que la requerida para otras acciones (inactivación de la fosfodiesterasa o liberación directa del Ca^{2+} intracelular); y 3) la emprofilina, una metilxantina sin acción adenosínica, también carece del efecto potenciador de la contractilidad⁸.

No obstante, este punto de vista no es compartido por todos los autores ya que, en otros estudios se ha observado que ni el verapamil³ ni la adenosina¹⁵ son capaces de modificar la contractilidad diafragmática.

Una última posibilidad establece que las metilxantinas, prescindiendo de cualquier otra fuente de Ca^{2+} , actuarían directamente sobre las vesículas del RS, liberando el Ca^{2+} allí almacenado²⁵. De acuerdo con este supuesto, hemos podido comprobar cómo en nuestras condiciones experimentales, el efecto potenciador contráctil de las metilxantinas no se vió modificado por la ausencia de Ca^{2+} en el medio ni por verapamil. Por otra parte, el hecho de que fueran capaces de revertir la inhibición producida por el dantroleno nos hace suponer que su acción es independiente del Ca^{2+} unido a la membrana del túbulo "T" y, por tanto, confirmaría esta última hipótesis. Las diferencias con otros estudios experimentales que afirman que el efecto de las metilxantinas depende directamente del Ca^{2+} extracelular, sólo pueden ser atribuidas, al igual que antes, a las diversas especies utilizadas y nos obligan a ser cautos al tratar de extrapolar los resultados obtenidos en modelos animales experimentales al diafragma humano.

En conclusión, podemos decir que los resultados obtenidos en el presente estudio nos indican que: a) la contractilidad diafragmática, al igual que en el resto de los músculos esqueléticos, sólo depende parcialmente del Ca^{2+} extracelular; y b) teofilina y cafeína potencian significativamente esta contractilidad al favorecer la biodisponibilidad del Ca^{2+} intracelular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roussos C, Macklem PT. The respiratory muscles. *N Engl J Med* 1982; 307:786-797.
2. Roussos C. Respiratory muscle fatigue in hypercapnic patient. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1979; S15:117-123.
3. Dimarco A, Nochomovitz M, Dimarco M, Altose M, Kelsen S. Comparative effects of aminophylline on diaphragm and cardiac contractility. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:800-805.
4. Aubier M, Murciano D, Viies N, Lecocguic Y, Palacios S, Pariente R. Increased ventilation caused by improved diaphragmatic efficiency during aminophylline infusion. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:148-154.
5. Sigrist S, Howell T, Roussos C. The effect of aminophylline on inspiratory muscle contractility. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:46-50.
6. Aubier M, De Troyer A, Sampson M, Macklem P, Roussos C. Aminophylline improves diaphragmatic contractility. *N Engl J Med* 1981; 305:249-252.



7. Supinsky G, Deal CH, Kelsen S. The effects of caffeine and theophylline on diaphragm contractility. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:429-433.
8. Murciano D, Aubier M, Viires N, Mal H, Pariente R. Effects of theophylline and emprophylline on diaphragmatic contractility. *J Appl Physiol* 1987; 63:51-57.
9. Murciano D, Aubier M, Lecocguic Y, Pariente R. Effects of theophylline on diaphragmatic strength and fatigue in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1984; 311:349-353.
10. Murciano D, Aubier M, Auclair MH et al. Effects of long-term theophylline administration on dyspnea, arterial blood gases and respiratory muscle performance in COPD patients. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:A150.
11. Moxham J, Miller J, Wiles CM, Morris A, Green M. Effect of aminophylline on the human diaphragm. *Thorax* 1985; 40:288-292.
12. Cooper C, Davidson AC, Cameron IR. Aminophylline, respiratory muscle strength and exercise tolerance in chronic obstructive airway disease. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1987; 23:15-22.
13. Viires N, Aubier M, Murciano D, Marty CH, Pariente R. Effects of theophylline on isolated diaphragmatic fibers. A model for pharmacologic studies on diaphragmatic contractility. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:1060-1064.
14. Wittmann T, Kelsen S. The effect of caffeine on diaphragmatic muscle force in normal hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126:499-504.
15. Supinski G, Deal CH, Kelsen S. Comparative effects of theophylline and adenosine on respiratory skeletal and smooth muscle. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:809-813.
16. Standaert FG, Dretchen K, Skuhall LR et al. Role of cyclic nucleotides in neuromuscular transmission. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 199:553-564.
17. Kolbeck R, Speir W. Diltiazem, verapamil and nifedipine inhibit theophylline-enhanced diaphragmatic contractility. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:139-145.
18. Aubier M, Murciano D, Viires N, Lecocguic Y, Pariente R. Diaphragmatic contractility enhanced by aminophylline: role of extracellular calcium. *J Appl Physiol*. 1983; 54:460-464.
19. Esau S. Interaction of theophylline, verapamil, and diltiazem on hamster diaphragm muscle force in vitro. *Am J physiol* 1988; 254(Cell Physiol. 23): C365-C371.
20. Ridings J, Barry S, Faulkner J. Aminophylline enhances contractility of frog skeletal muscle: an effect dependent on extracellular calcium. *J Appl Physiol* 1989; 67:671-676.
21. Nakajima Y, Endo M. Release of calcium induced by depolarization of the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature* 1973; 246:216-218.
22. Endo M, Tanaka M, Ogawa Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers. *Nature* 1970; 228:34-36.
23. Viires N, Murciano D, Seta JP, Dureuil B, Pariente R, Aubier M. Effects of calcium withdrawal on diaphragmatic fiber tension generation. *J Appl Physiol* 1988; 64:26-30.
24. Aubier M, Viires N, Piquet J et al. Effects of hypocalcemia on diaphragmatic strength generation. *J Appl Physiol* 1985; 58:2054-2061.
25. Frank G. The current view of the source of trigger calcium in excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle. *Biochem Pharmacol* 1980; 23:99-2406.
26. Lieberman D, Faulkner J, Craig A, Maxwell L. Performance and histochemical composition of guinea pig and human diaphragm. *J Appl Physiol* 1973; 34:233-237.
27. Bravo J, Rogers N, Grafford JC et al. Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3'-5'-monophosphate phosphodiesterase activity. *Mol Pharmacol* 1970; 6:597-603.