

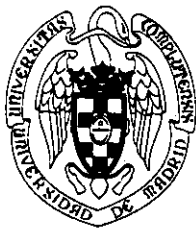
TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS ESQUELÉTICAS EN ATLETAS DE ÉLITE

**Jacobo López de Rego Martínez
1998**



Estudio de los cambios morfológicos y funcionales de las fibras musculares estriadas esqueléticas en atletas de élite



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA FÍSICA
Y DE REHABILITACIÓN • HIDROLOGÍA MÉDICA

LUIS PABLO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO-DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA FÍSICA Y DE REHABILITACIÓN. HIDROLOGÍA MÉDICA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA que Don **JACOBO LÓPEZ DE REGO MARTÍNEZ**, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "**Estudio de los cambios morfológicos y funcionales de las fibras musculares estriadas esqueléticas en atletas de élite**". Este trabajo, tras la revisión de la literatura científica, se ha desarrollado con la metodología apropiada y específica para la resolución de las hipótesis planteadas y los resultados han sido analizados de forma minuciosa y pormenorizada. Se trata de un trabajo original e interesante que reúne todos los requisitos metodológicos para poder ser defendido como Tesis Doctoral y optar al Grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste, lo firmo en Madrid a 21 de septiembre de mil novecientos noventa y ocho

A Reyes

Esta Tesis, que se presenta para optar al Grado de Doctor en Madrid, es un trabajo compartido con numerosas personas. Con ellas he colaborado y aprendido, de una manera u otra, a lo largo de varios años. No desearía olvidar a ninguna de ellas:

** PROF. DR. D. LUIS PABLO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, Director de la presente Tesis, Director del Dpto. de Medicina Física y Rehabilitación, Facultad de Medicina de la U.C.M.*

** PROF^a. DR^a. D^a. REYES FLORES HERRÁEZ, Dpto. de Biología Celular, Facultad de Medicina de la U.C.M.*

** PROF. DR. D. EDUARDO GARCÍA POBLETE, Dpto. de Biología Celular, Facultad de Medicina de la U.C.M.*

** DR. D. FRANCISCO LEYVA COBIÁN, Servicio de Inmunología del Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla". Santander.*

** PROF^a. DR^a. D^a. PILAR SIMÓN HUARTE, Dpto. de Biología Celular, Facultad de Medicina de la U.C.M.*

** Personal Técnico de la Facultad de Medicina: D^a. ADELA PÉREZ VERT, D^a. BELÉN MORENO MENGIBAR y D^a. ISABEL MONTERO CALVO.*

** Personal Técnico del Centro de Microscopía Electrónica "Luis Bru" de la U.C.M.: D. AGUSTÍN FERNÁNDEZ LARIOS y D. EUGENIO BALDONEDO RODRÍGUEZ.*

Y de una forma especial y a modo de pequeño homenaje póstumo al PROF. DR. D. LUIS ZAMORANO SANABRA, por todos los años que dedicó a hacernos profundizar en el estudio de la Histología, derrochando ilusión y fomentando el compañerismo, con esa alegría que le caracterizó. Aparte de su magisterio, debo agradecerle muy especialmente la amistad con la que me honró.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.

- 1.- TEJIDO MUSCULAR: GENERALIDADES. 2.
- 2.- MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO. 2.
 - 2.1.- ORGANIZACIÓN MACROSCÓPICA DEL MÚSCULO ESTRIADO. 2.
 - 2.2.- LA CÉLULA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA. 3.
 - 2.2.1.- Estudio con microscopía óptica. 3.
 - 2.2.2.- Ultraestructura de la célula muscular estriada esquelética. 5.
 - 2.2.2.1.- Núcleos. 5.
 - 2.2.2.2.- Miofibrillas. 6.
 - 2.2.2.2.1.- Composición bioquímica de las miofibrillas. 9.
 - 2.2.2.3.- Sarcolema. 15.
 - 2.2.2.4.- El sarcoplasma y sus componentes. 16.
 - 2.3.- CÉLULAS SATÉLITES. 20.
 - 2.4.- VASCULARIZACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO. 24.
 - 2.5.- INERVACIÓN DEL MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO. 24.
 - 2.5.1.- Unión neuromuscular. 25.
 - 2.5.2.- Huso neuromuscular. 28.
 - 2.6.- TEJIDOS CONECTIVOS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO. 31.
 - 2.6.1.- Vainas musculares. 31.
 - 2.6.2.- Unión miotendinosa. 31.
 - 2.7.- EMBRIOLOGÍA. 33.
- 3.- HETEROGENEIDAD DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS EXTRAFUSALES. 38.
 - 3.1.- RECUERDO HISTÓRICO. 38.
 - 3.2.- DIFERENCIACIÓN HISTOQUÍMICA. 39.
 - 3.3.- ESTUDIOS INMUNOCITOQUÍMICOS. 44.
 - 3.4.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS EN LOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRAS. 48.
 - 3.4.1.- Variaciones en la superficie de corte de la fibra. 48.
 - 3.4.2.- Variaciones en las mitocondrias. 49.
 - 3.4.3.- Variaciones en las miofibrillas. 49.
 - 3.4.4.- Variaciones en el retículo sarcoplásmico. 51.
 - 3.4.5.- Variaciones en la placa motora. 51.
 - 3.4.6.- Variaciones en la vascularización. 55.
- 4.- FISIOLOGÍA. 56.
 - 4.1.- MECANISMO BÁSICO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR. 56.
 - 4.2.- PRODUCCIÓN DE ENERGÍA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO. 62.
 - 4.2.1.- Almacenamiento de alta energía. 62.
 - 4.2.2.- Almacenamiento de sustrato energético. 62.

4.3.- PROPIEDADES FÍSICAS DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR. 64.

- 4.3.1.- Propiedades mecánicas. 65.
- 4.3.2.- Tipos de contracción muscular. 66.
- 4.3.3.- Velocidad de contracción. 67.
- 4.3.4.- Rendimiento de la contracción. 67.
- 4.3.5.- Estímulo nervioso. 68.

5.- VARIACIONES EN EL TEJIDO MUSCULAR ESTRIADO ESQUELÉTICO CON EL EJERCICIO. 69.

5.1.- CRECIMIENTO DE LA FIBRA MUSCULAR. 69.

- 5.1.1.- Crecimiento longitudinal de las miofibrillas. 71.
- 5.1.2.- Crecimiento transversal de las miofibrillas. 73.
- 5.1.3.- Variaciones en el retículo sarcoplásmico y sistema T. 76.
- 5.1.4.- Variaciones en la dotación mitocondrial. 77.
- 5.1.5.- Variaciones en la capacidad metabólica de la fibra muscular. 78.

5.2.- CRECIMIENTO DEL TEJIDO CONECTIVO MUSCULAR. 83.

- 5.2.1.- Variaciones en las vainas musculares. 84.
- 5.2.2.- Variaciones en los capilares de la fibra muscular. 85.

5.3.- CAPACITACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SATÉLITES. 87.

5.4.- CAMBIOS EN EL CONTROL NERVIOSO DE LA UNIDAD MOTORA. 89.

5.5.- POSIBILIDAD DE CAMBIO EN EL TIPO DE DOTACIÓN FIBRILAR DEL MÚSCULO CON EL EJERCICIO. 91.

OBJETIVOS.

6.- OBJETIVOS. 96.

MATERIAL Y MÉTODO.

7.- MUESTRA. 99.

7.1.- SELECCIÓN DE LA MUESTRA. 99.

7.2.- TÉCNICA DE LA BIOPSIA. 101.

- 7.2.1.- Características de la aguja. 101.
- 7.2.2.- Toma de muestras. 101.
- 7.2.3.- Características del músculo vasto externo. 103.

8.- PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO. 105.

8.1.- MICROSCOPIA ÓPTICA. 105.

8.2.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. 105.

9.- PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA ESTUDIO HISTOQUÍMICO. 106.

9.1.- TÉCNICAS ENZIMÁTICAS UTILIZADAS. 106.

9.2.- LOCALIZACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES EN LOS CORTES HISTOLÓGICOS. 109.

10.- ANÁLISIS DE IMÁGENES, MÉTODO ESTADÍSTICO Y TRATAMIENTO INFORMÁTICO. 110.

RESULTADOS.

11.- VARIACIONES CUALITATIVAS DE LAS FIBRAS MUSCULARES EN RELACIÓN CON EL EJERCICIO FÍSICO. 114.

11.1.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE RESISTENCIA. GRUPO R21. 114.

11.2.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE RESISTENCIA. GRUPO R25. 122.

11.3.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE VELOCIDAD. GRUPO V21. 130.

11.4.- VARIACIONES EN LOS ATLETAS DE VELOCIDAD. GRUPO V25. 137.

12.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS VARIACIONES QUE PRESENTA EL MÚSCULO ESQUELÉTICO SEGÚN LA ACTIVIDAD DEPORTIVA. 143.

12.1.- VARIACIONES EN PORCENTAJE DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES. 143.

12.1.1.- Fibras tipo I. 144.

12.1.2.- Fibras tipo IIa. 145.

12.1.3.- Fibras tipo IIb. 146.

12.1.4.- Fibras IIc. 147.

12.2.- CAMBIOS EN LAS DIMENSIONES DE LA SUPERFICIE MEDIA DE CORTE TRANSVERSAL DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS. 157.

12.2.1.- Fibras tipo I. 157.

12.2.2.- Fibras tipo IIa. 158.

12.2.3.- Fibras tipo IIb. 159.

12.2.4.- Fibras tipo IIc. 160.

12.3.- VARIACIONES DEL VOLUMEN MITOCONDRIAL EN RELACIÓN AL VOLUMEN DE CADA TIPO DE FIBRA. 166.

12.3.1.- Fibras tipo I. 166.

12.3.2.- Fibras tipo IIa. 167.

12.3.3.- Fibras tipo IIb. 168.

12.3.4.- Fibras tipo IIc. 169.

12.4.- ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS VARIACIONES EN EL NÚMERO DE CAPILARES EN LOS DIFERENTES GRUPOS DEL PROTOCOLO. 176.

DISCUSIÓN.

13.- VALORACIÓN DEL MÉTODO UTILIZADO. 181.

13.1.- EXTRACCIÓN DE MUESTRAS. 181.

13.2.- DETERMINACIÓN DE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS. 182.

13.3.- VALORACIÓN DEL ANÁLISIS MORFOMÉTRICO. 184.

14.- VALORACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES EN CADA TIPO DE FIBRAS. 184.

14.1.- VARIACIONES EN LA SUPERFICIE DE CORTE TRANSVERSAL. 185.

14.2.- VARIACIONES EN LA DOTACIÓN MITOCONDRIAL. 186.

14.3.- VARIACIONES EN EL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO Y TÚBULOS T. 189.

14.4.- VARIACIONES EN EL SUSTRATO ENERGÉTICO. 191.

15.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS INDUCIDAS POR EL EJERCICIO EN CADA GRUPO DE NUESTRO PROTOCOLO. 192.

15.1.- VARIACIONES EN EL CRECIMIENTO LONGITUDINAL. 192.

15.2.- VARIACIONES EN EL CRECIMIENTO TRANSVERSAL. 202.

15.3.- VARIACIONES EN EL TEJIDO CONJUNTIVO. 209.

16.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS CUANTITATIVOS. 212.

16.1.- VARIACIONES EN LA PROPORCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS. 212.

16.1.1.- Población control. 212.

16.1.2.- Deportistas de resistencia. 213.

16.1.3.- Deportistas de velocidad. 215.

16.2.-VARIACIONES EN LA SUPERFICIE DE CORTE TRANSVERSAL. 217.

16.2.1.- Variaciones en el grupo control. 218.

16.2.2.- Variaciones en el grupo de deportistas de resistencia. 220.

16.2.3.- Variaciones en el grupo de deportistas de velocidad. 221.

16.3.- VARIACIONES CUANTITATIVAS EN LA DOTACIÓN MITOCONDRIAL. 221.

16.3.1.- Variaciones en la población control. 223.

16.3.2.- Variaciones en los deportistas de resistencia. 224.

16.3.3.- Variaciones en los deportistas de velocidad. 226.

16.4.- VARIACIONES EN LA DENSIDAD DE CAPILARES. 228.

16.4.1.- Población control. 230.

16.4.2.- Deportistas de resistencia. 231.

16.4.3.- Deportista de velocidad. 232.

17.- ADAPTABILIDAD DE LA FIBRA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA: CAMBIOS EN EL FENOTIPO. 234.

CONCLUSIONES.

18.- CONCLUSIONES. 240.

BIBLIOGRAFÍA.

19.- BIBLIOGRAFÍA. 246.

TABLA DE ABREVIATURAS

α -GPDH.- α -Glicerofosfato deshidrogenasa.	Pm.- Peso molecular.
AcCo.- Acetil colina.	PoAb.- Anticuerpo policlonal.
Actina G.- Actina globular.	RNA _m .- Ácido ribonucleico mensajero.
ADP.- Adenosín difosfato.	RNA _r .- Ácido ribonucleico ribosómico.
AMP.- Adenosín monofosfato.	RS.- Retículo sarcoplásmico.
ATP.- Adenosín trifosfato.	SDH.- Succino deshidrogenasa.
CK.- Creatinina quinasa.	SO.- Oxidativa lenta.
CP.- Creatinina fosfatasa.	ST.- Tipo lento.
DNA.- Ácido dexosirribonucleico.	TG.- Triglicéridos.
DPN.- Difosfopiridín nucleótido.	TGF.- Factor de crecimiento y transformación.
EDL.- Extensor digitorum longus.	TM.- Tropomiosina.
FG.- Glicolítica rápida.	TnC.- Troponina C.
FOG.- Glicolítica oxidativa rápida.	TNF.- Factor de necrosis tumoral.
FT.- Tipo rápido.	TnI.- Troponina I.
HDL2-C.- Lipoproteína de alta densidad- colesterol.	TnT.- Troponina T.
IL.- Interleucina.	TPN.- Trifosfopiridín nucleótido.
kDa.- Kilodalton.	Túbulos T.- Túbulos transversos.
LDH.- Láctico deshidrogenasa.	VCO ₂ .- Volumen de anhídrido carbónico.
MBP.- Proteínas asociadas a miosinas.	VLDL-TG.- Lipoproteínas de muy baja densidad- triglicéridos.
MHC.- Cadena pesada de miosina.	VO ₂ .- Volumen de oxígeno.
MHCf.- Cadena pesada de miosina rápida.	VO ₂ max.- Volumen máximo de oxígeno.
MHCs.- Cadena pesada de miosina lenta.	
MLC.- Cadena ligera de miosina.	
MoAb.- Anticuerpo monoclonal.	
NADH-TR.- Naftil-acetil- deshidrogenasa tetrazolium-reductasa.	
PFK.- Fosfofructoquinasa.	
PGE1.- Prostaglandina E1.	
Pi.- Fósforo inorgánico.	

I n t r o d u c c i ó n

1.- TEJIDO MUSCULAR: GENERALIDADES.

La función motora activa en los organismos multicelulares, es asumida por células altamente especializadas, llamadas células musculares, capaces de responder con su contracción a estímulos adecuados. Esta función se realiza fundamentalmente por la transformación de energía química en energía mecánica, en el seno de la célula muscular o miocito. Es una propiedad común a cualquier tipo de célula animal, pero llega a su máxima expresión en estas poblaciones celulares. Para ello, casi todo su citoplasma está surcado por numerosos filamentos dispuestos ordenadamente en haces longitudinales, que al contraerse por interacción de unos con otros, acercan los extremos distales de la célula. Las características morfológicas de los miocitos vienen impuestas por su especialización funcional, para el mejor aprovechamiento de la energía. Su forma alargada y la disposición en haces ya nos habla de una gran capacidad de acortamiento y relajación.

Las necesidades de las diversas partes del organismo, en lo que concierne a tipos de contracción, no son iguales y van a determinar la existencia de diferentes tipos de fibras musculares, unas estriadas esqueléticas, otras estriadas cardíacas y un tercer grupo de fibras musculares lisas, que se van a diferenciar por el origen embriológico, la localización anatómica, la estructura microscópica, la innervación y la función.

El tejido muscular estriado esquelético, que es el que nos va a ocupar en el este estudio, viene definido ya desde Bichat, como el que compone los músculos de la vida animal o de relación. Es rojo, estriado y de origen miotómico. Todas las células que lo componen son alargadas y cada una posee numerosos núcleos periféricos, así como una estriación transversal a lo largo de todo el citoplasma, visible con microscopía óptica. Están controladas por el sistema cerebro-espinal y poseen contracción voluntaria. De la misma manera, la distribución y constitución del tejido conjuntivo que acompaña a estas estructuras, es esencial para el aporte de oxígeno y sustancias nutritivas, que necesitan de forma abundante. Está asociado el esqueleto por medio de los tendones, como punto de anclaje que los miocitos precisan para que su contracción produzca un desplazamiento de alguna parte del cuerpo, que es esencialmente el fin de su función.

2.- MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.

2.1.- ORGANIZACIÓN MACROSCÓPICA DEL MÚSCULO ESTRIADO.

Al estudiar un corte transversal de un músculo estriado, vemos cómo todo el paquete muscular, de aspecto carnoso y rojizo, está rodeado por una vaina resistente de tejido conjuntivo denso, al que denominamos epimisio. Desde dicha capa, entran o salen vasos sanguíneos al interior del músculo. A partir de él se originan tabiques del mismo tejido, ricos en fibras colágenas, que penetran en el espesor de la masa

muscular, hasta rodear grupos de miocitos formando fascículos. Tales tabiques constituyen el perimysio y también conducen vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas. Desde el perimysio parten tabiques aun más finos, solo visibles con microscopía óptica, del mismo tejido conjuntivo, formando una red que se extiende longitudinalmente entre cada célula muscular, constituyendo el endomysio. Esta última porción es muy rica en capilares y fibras nerviosas terminales, que proporcionan nutrición e inervación directamente a los miocitos. (Figura1). Sin este almacén conjuntivo complejo y de alta significación funcional, la masa muscular, tan deformable y plástica, carecería de forma fija. Desde el punto de vista morfológico, los músculos se han dividido en base a su forma general y a su arquitectura fascicular, pero nosotros no vamos a profundizar en este apartado esencialmente anatómico (Williams y Warwick, 1985).

2.2.- LA CÉLULA MUSCULAR ESTRIADA ESQUELÉTICA.

2.2.1.- Estudio con microscopía óptica.

Por disociación de un fragmento de músculo esquelético, es posible llegar a separar elementos largos, generalmente cilíndricos, que son las células musculares estriadas. Tienen gran tamaño, si las comparamos con las de otros tejidos. Sus dimensiones transversales varían de 10 a 100 μm o más y su longitud pueden oscilar entre 1 y 40 mm, aunque ocasionalmente se han descrito hasta de 10 cm. Estas fibras, en cualquier músculo dado, tienden a poseer un calibre bastante constante, pero varían de un músculo a otro y según la especie que se considere (Figura 2).

Cada célula está limitada en su periferia por una membrana plasmática, bordeada exteriormente por una lámina basal, de reacción PAS⁺. El conjunto constituye el sarcolema (Mauro y Adams, 1961). Esta lámina externa está en contacto con una fina capa de tejido conjuntivo interfibrilar (Figura 3).

La mayor parte del citoplasma está ocupado por las miofibrillas (en el hombre más de 100 millones/ cm^2), que son el componente característico de la célula (Bowman, 1840), su conjunto constituye el mioplasma. En secciones transversales preparadas con técnicas antiguas, estas miofibrillas aparecen agrupadas formando pequeñas áreas poligonales, denominados campos de Cohnheim, que en la actualidad se consideran como resultado de la retracción que sufre el tejido durante la fijación.

Al corte longitudinal se observa cómo las miofibrillas se disponen paralelas entre sí, siguiendo el eje mayor de la célula, y están atravesadas por estriaciones aparentemente continuas y rectas que se alternan a lo largo de la fibra (Szent-Györgyi, 1953). Estas estriaciones muestran distinta afinidad por los colorantes y diferentes propiedades ópticas. Unas se tiñen débilmente con colorantes básicos y son isótropas con luz

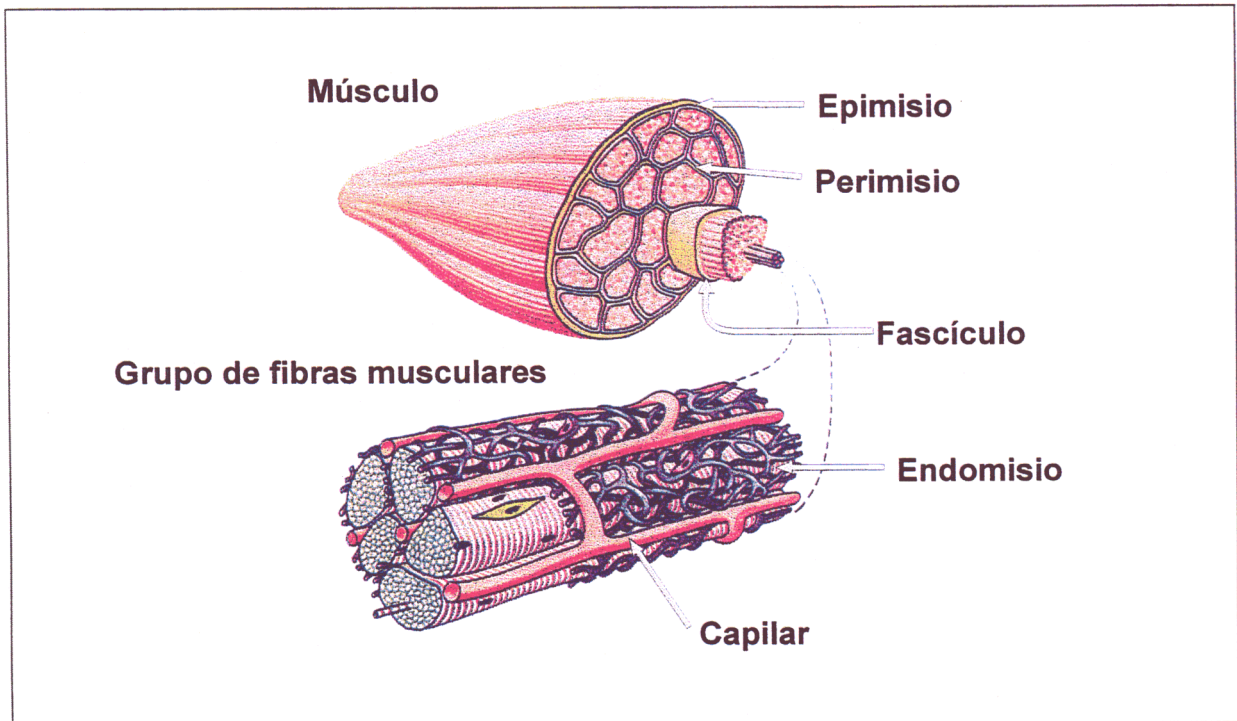


Figura 1.- Esquema de los distintos niveles de organización del músculo estriado esquelético: componentes estructurales y sus respectivas envolturas. Modificado de Williams y Warwick, 1985.

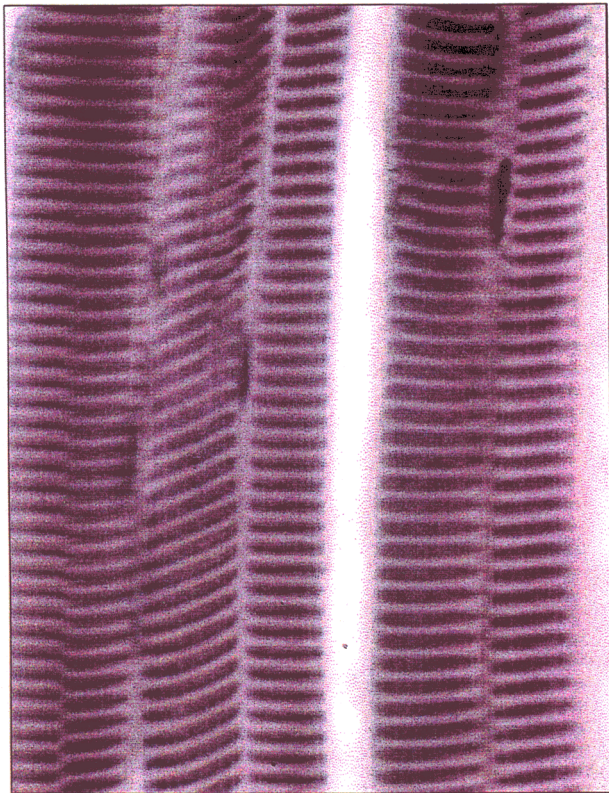


Figura 2.- Corte longitudinal de fibras musculares estriadas esqueléticas, en las cuales puede observarse la alternancia de bandas. Tinción de Jabonero. 500x.

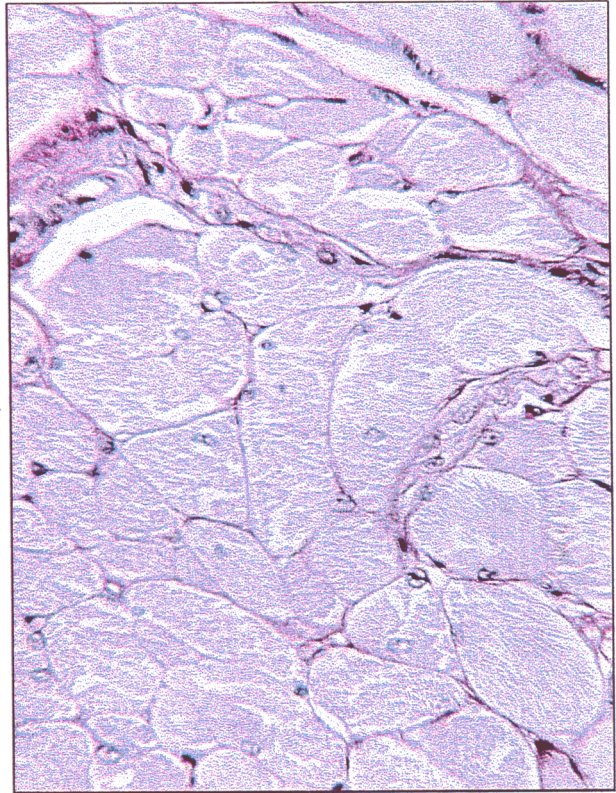


Figura 3.- Corte transversal de fibras musculares esqueléticas, bordeadas de la lámina basal con reacción PAS+. 500x.

polarizada, denominándolas bandas I. Otras reaccionan con intensidad a la hematoxilina y giran fuertemente el plano de luz polarizada, llamándolas bandas A o anisótropas. Las bandas I se dividen en dos por otra banda delgada, más oscura, llamada línea Z (membrana o estría de Krause). La banda A está también atravesada por una zona más pálida, la banda H (de Hensen) y en el interior de esta última, se puede apreciar una tenue línea más oscura, denominada línea M. El significado de estas diferentes bandas y su comportamiento durante la contracción, fueron descubiertos y estudiados independientemente por dos grupos de investigadores, A.F. Huxley y Neidergerke (1954) y H.E. Huxley y Hanson (1954) (Figura 4), nosotros profundizaremos en este estudio en el apartado correspondiente a ultraestructura.

El citoplasma restante o sarcoplasma, contiene los demás elementos celulares: Los núcleos, de forma alargada y orientados según el eje mayor de la células, se encuentran situados en la periferia, inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, en número proporcional al volumen de cada miocito, pudiendo llegar a varios centenares por célula. Miden de 5 a 10 μm de longitud y de 1 a 3 μm de anchura y pueden presentar uno o dos nucleolos. Los sáculos del aparato de Golgi se sitúan en las proximidades de los polos nucleares, así como las mitocondrias, aunque también hay gran cantidad de ellas dispuestas en hileras entre las miofibrillas. En el sarcoplasma periférico existen ribosomas y, hay depósitos de glucógeno, gotas lipídicas y mioglobina homogéneamente distribuidos. El retículo endoplásmico o retículo sarcoplásmico (RS), está muy desarrollado y en relación directa con la arquitectura de las miofibrillas, como veremos más adelante.

2.2.2.- Ultraestructura de la célula muscular estriada esquelética.

2.2.2.1.- Núcleos.

Rechazados periféricamente por la estructura miofibrilar citoplásmica y situados debajo del sarcolema, los núcleos del miocito tiene la estructura típica de un núcleo metabólicamente activo: una cantidad moderadamente abundante de heterocromatina a lo largo de la cara interna de la carioteca (Moore y Ruska, 1957) en relación con la lámina nuclear (Franke, 1987) y abundante eucromatina que puede llegar hasta el 76% del volumen nuclear (Figura 5). El porcentaje de eucromatina varía en los diferentes músculos, dependiendo de la cantidad de trabajo que realizan habitualmente (Snow, 1983). Presentan uno o varios nucleolos, como reflejo de su constante actividad de síntesis proteica en relación con la actividad muscular (Scheer y cols., 1993). La envoltura nuclear esta formada por dos membranas y la más externa se relaciona con los elementos del retículo sarcoplásmico (Peachey 1965). Los poros nucleares descritos por Watson (1959), se hacen más patentes en fibras en regeneración (Price y cols., 1964). A pesar de su abigarrada estructura, representan el único camino directo entre

el núcleo y el citoplasma para el paso continuo de moléculas polares, iones, proteínas y RNAm (Pante y cols., 1993).

2.2.2.2.- Miofibrillas.

Este componente, que ocupa un 85-90 % del volumen citoplásmico, se extiende longitudinalmente de un extremo a otro de la célula. Los datos relativos a su ultraestructura, permiten confirmar los ya conocidos por el estudio con microscopía óptica y precisar las dimensiones de las diferentes bandas. Así vemos cómo las miofibrillas miden de 1 a 2 μm de diámetro. Longitudinalmente, la banda A tiene del orden de 1,5 a 1,6 μm en los vertebrados, permaneciendo constante en reposo y contracción. Se observa mejor la banda H y línea M central, determinando además una zona más clara a ambos lados de la línea M denominada banda L o pseudobanda H (Huxley y Niederggerke, 1954; Huxley y Hanson, 1954). La banda I, dividida en dos por la línea Z, mide 0,8 μm en reposo, pero disminuye durante la contracción (Page, 1969). La porción de miofibrillas comprendida entre dos estrías Z constituye una sarcómera, verdadera unidad contráctil, con una longitud de 2 a 3 μm en el hombre. A pesar de esta variación en la longitud total de la sarcómera durante la contracción, la longitud de los filamentos integrantes, permanece constante (Sosa y cols, 1994) (Figura 6).

A mediados de los años 50, el estudio del músculo con microscopía electrónica y el empleo de los métodos de difracción de rayos X, permitió, no solo interpretar los datos aportados por el microscopio óptico, sino también conocer nuevos e importantes argumentos sobre la estructura de las miofibrillas, como el hecho de que las bandas A e I contenían estructuras cilíndricas finas de orientación longitudinal, que recibieron el nombre de miofilamentos, identificando dos tipos de ellos, unos finos y otros gruesos, con una distribución característica de cada uno de ellos (Huxley, 1957; 1963; Page y Huxley, 1963).

En la misma época y basándose en los análisis bioquímicos que se desarrollaron en la primera mitad de este siglo, se llegó a conocer que en la composición de la célula muscular intervienen sobre todo dos proteínas: la actina y la miosina (Hasselbach, 1953; Perry y Corsi, 1958). La recombinación de ambas "in vitro" forma un complejo denominado actomiosina, que precipita en forma de fibrillas, con una disposición de estrías transversales, similar a la que se observó en el músculo.

Los filamentos gruesos de miosina, de un diámetro de 15 nm y con una longitud del orden de 1,5 μm , están dispuestos a todo lo largo de la banda A. Están erizados de expansiones bilaterales de alrededor de 13 nm de longitud, que actúan como puentes de unión. Dos expansiones del mismo nivel, situadas de manera simétrica a un lado y otro del filamento, representan un par. Cada par está diferenciado del siguiente por un intervalo de 14,3 nm y forma con los filamentos un ángulo de 12 nm. Esta disposición

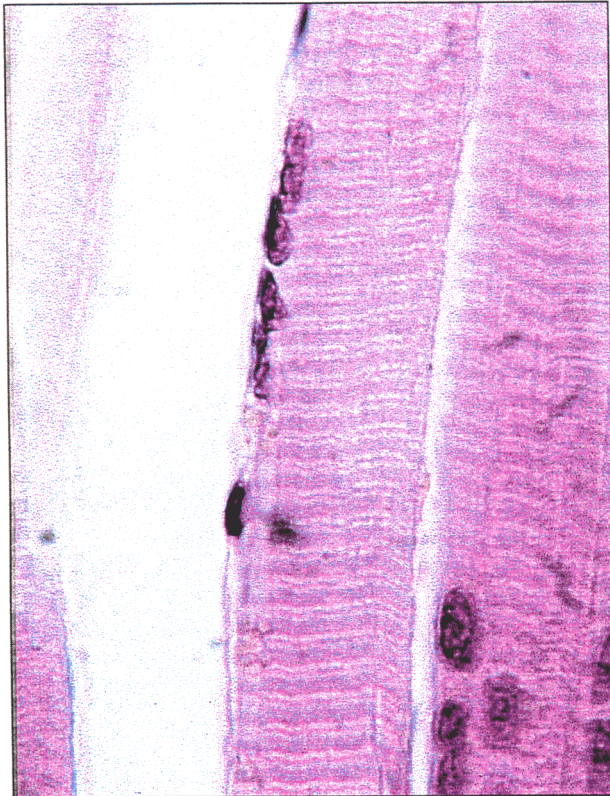


Figura 4.- Sección longitudinal de fibras musculares estriadas esqueléticas, apreciándose claramente las bandas A e I, así como la línea Z. H.E. 800x.



Figura 5.- Núcleo del miocito esquelético con su morfología típica y disposición característica de la cromatina. MET. 10000x.

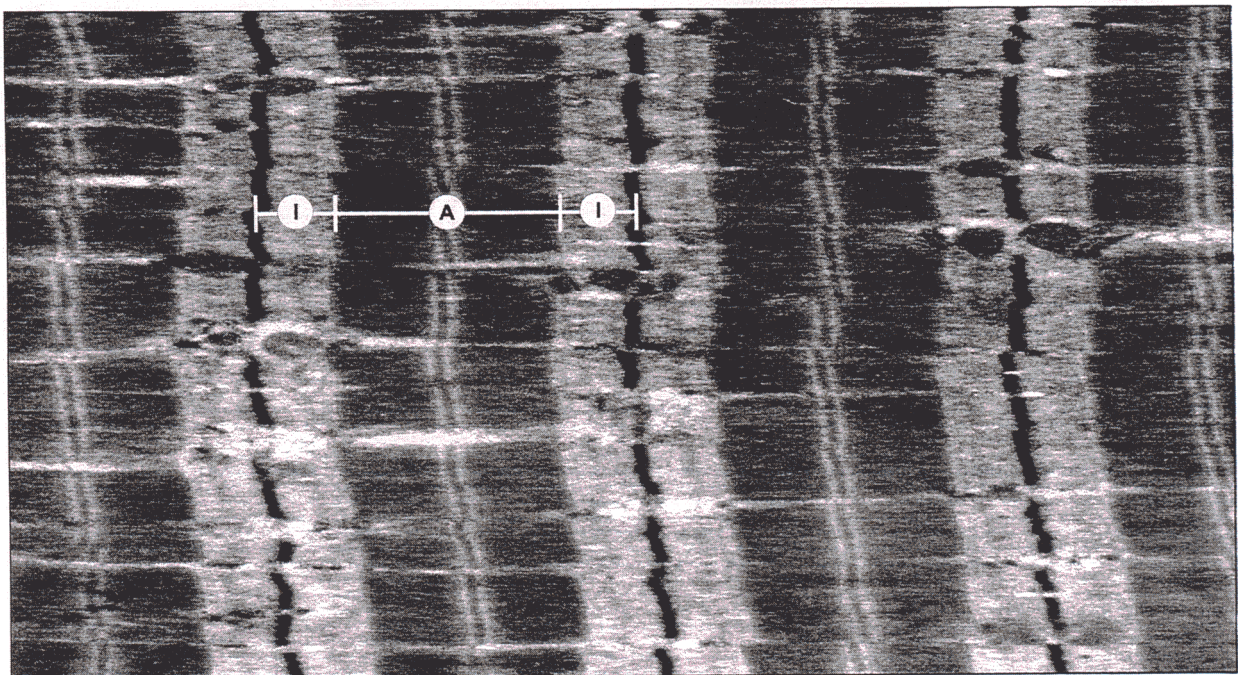


Figura 6.- Corte longitudinal de miofibrillas, con disposición en serie de sus sarcómeros. Estas estructuras están delimitadas por dos líneas Z, que delimitan dos semibandas I y una banda A entre ellas. En el centro de esta última pueden apreciarse las bandas H y la línea M. MET. 25000x.

espacial, describe así una hélice, cuyo paso es de 42,9 nm ($3 \times 14,3$ nm) (Huxley y Brown, 1967; Huxley, 1969) (Figura 7).

Los filamentos finos de actina, de 5 a 7 nm de diámetro y longitud de 1 μ m, se extienden a un lado y a otro de la estría Z en toda la longitud de la banda I. Penetran en la banda A entre los filamentos gruesos y se disponen paralelamente a ellos, pero sin llegar a la línea M, delimitando así, por los dos lados de ella, una región de baja densidad, desprovista de filamentos finos, la estría H. Cada filamento de actina está compuesto por dos cadenas enrolladas una sobre otra, constituida cada una por subunidades globulares de 5,46 nm, sufriendo de una cadena a otra un intervalo de decalaje de 2,73 nm, es decir, el valor de una subunidad. Las dos cadenas se cruzan regularmente cada 35,5 nm, determinando un paso de hélice de 71 nm (Hanson y Lowy, 1963; Huxley, 1963; 1965) (Figura 7).

Posteriormente se han caracterizado otros componentes proteicos filamentosos que forman parte de la sarcómera: Las filamentos de nebulina (Wang y Wright, 1988), que están asociados en toda su extensión con los filamentos finos, y ambos se insertan en el disco Z. Los filamentos de titina (Wang y cols., 1979), que también están estrechamente asociados a los filamentos gruesos, pero se prolongan por la banda I para insertarse en el disco Z.

La organización espacial de los filamentos finos y gruesos es particularmente evidente en los cortes transversales efectuados a diferentes niveles de la miofibrilla:

En la banda A, los dos tipos de filamentos coexisten. Los filamentos finos están repartidos entre los gruesos siguiendo un modelo hexagonal constante. Un filamento grueso está rodeado por una corona de 6 filamentos finos, cada uno situado a igual distancia de los tres filamentos gruesos vecinos. Los filamentos finos están separados entre sí por una distancia de 40 a 50 nm, en tanto que la distancia entre los filamentos gruesos y delgados es de solo 15 a 20 nm. De ellos se destacan las expansiones laterales descritas precedentemente. Estas últimas aseguran el contacto entre filamentos gruesos y finos en el curso de la contracción muscular. Dada la disposición helicoidal de las expansiones, cada filamento grueso se unirá a cada uno de los 6 filamentos finos que le rodean a lo largo de 42,9 nm (Skubishak, 1996). A nivel de la banda H, sólo son visibles los filamentos gruesos, distantes 45 nm y dispuestas según un esquema hexagonal. En la vecindad inmediata de la línea M, los filamentos gruesos, pierden sus expansiones laterales delimitando a un lado y otro de ella, en el seno de la estría H, la región más clara, que corresponde a la zona pseudo H. A nivel de la línea M, los filamentos gruesos están unidos entre ellos por un sistema de puentes muy visibles (los puentes M). La estructura de la línea M es más compleja de lo que se esperaba. Los puentes M que unen los filamentos gruesos están dispuestos en tres capas, cada una perpendicular al eje mayor de los filamentos. Otras veces, cada

filamento grueso, está rodeado por 6 filamentos finos (filamentos M), de 5 a 6 nm de diámetro que son paralelos entre sí y cruzan los puentes M en su mitad (Knappeis y Carlsen, 1968) (Figura 8).

En la banda I solo persisten los filamentos finos, manteniendo su patrón de disposición regular, que adopta una forma de red cuadrática regular en la vecindad de la estría Z. La estructura de la línea Z es más compleja (Knappeis y Carlsen, 1962), los filamentos finos de dos sarcómeras vecinas terminan y se interpenetran en todo el espesor de la estría del orden de 40 a 80 nm (Gauthier, 1970). En una sección transversal, cada filamento fino de una sarcómera se sitúa en el centro de un cuadrado, formado por los 4 filamentos finos de la sarcómera contigua. Un sistema de puentes, los puentes Z, unen estos filamentos entre sí. Esta configuración espacial está aun en discusión. Esquemáticamente existe la posibilidad de dos clases de puentes Z, unos oblicuos que comunican los filamentos finos de dos sarcómeras adyacentes y los otros transversales que unirán los filamentos finos de una misma sarcómera (Ullrick y cols., 1977; Yamaguchi y cols., 1985) (Figura 9).

2.2.2.2.1.- Composición bioquímica de las miofibrillas.

Las miofibrillas están constituidas por proteínas del citoesqueleto que representan el 70 % de las proteínas totales del músculo, estando clasificadas en el grupo de microfilamentos. Las proteínas fibrilares están formadas por dos componentes esenciales: la miosina II (54 %), componente de los filamentos gruesos y la actina-F (25 %), elemento principal de los filamentos finos. A ellas hay que añadir más de una docena de proteínas asociadas, que colaboran en el mantenimiento de la trama regular de los microfilamentos para organizar las miofibrillas.

La disolución de la miosina con soluciones salinas hipertónicas apropiadas, hace desaparecer los filamentos gruesos, atestiguando así la presencia de este componente en la banda A de la miofibrilla. En las mismas condiciones la extracción de la actina hace desaparecer los filamentos finos y demuestran la presencia de ellos en la banda I y los semidiscos oscuros de la banda A. El análisis ponderal de los constituyentes fibrilares y el marcaje con anticuerpos fluorescentes, han permitido confirmar estos hechos.

La molécula de **miosina II**, posee una longitud total de alrededor de 150 nm y un Pm de 480 kDa. Está formada por dos cadenas pesadas polipeptídicas idénticas y cuatro cadenas ligeras iguales dos a dos. Cada una de las cadenas pesadas tienen un aspecto parecido al de un "bastón de jockey" con una cabeza de 7 nm y un mango 2 nm de diámetro. En estas proteínas el fragmento amino-terminal ocupa la cabeza formando además el dominio motor, mientras que el extremo carboxilo-terminal de la cola permite un sobre enrollamiento en hélice α entre dos cadenas pesadas que da lugar a un dímero estable, formado por dos cabezas y una única cola, que permitirá la polimeriza-

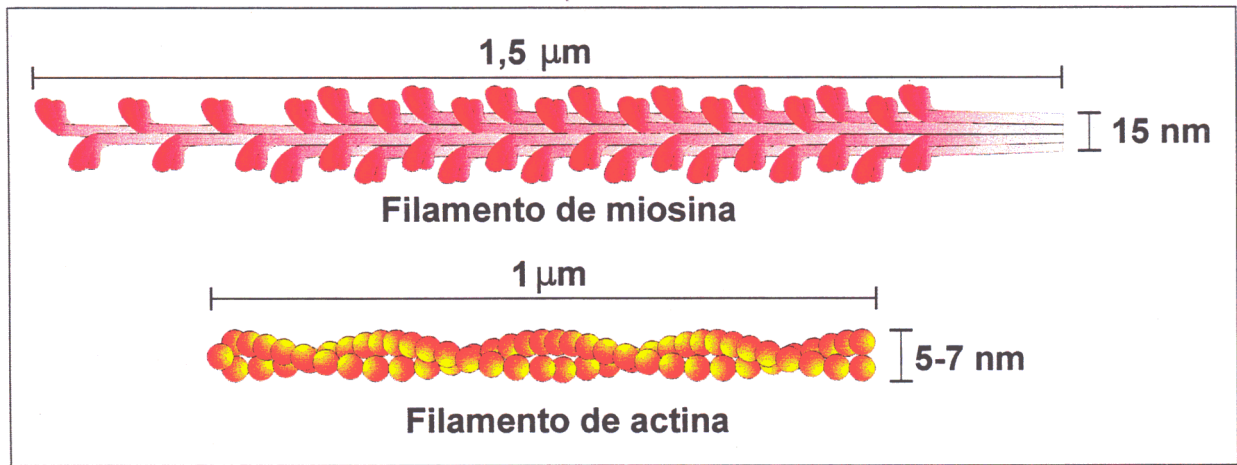


Figura 7.- Representación esquemática de los componentes moleculares que integran los microfilamentos.

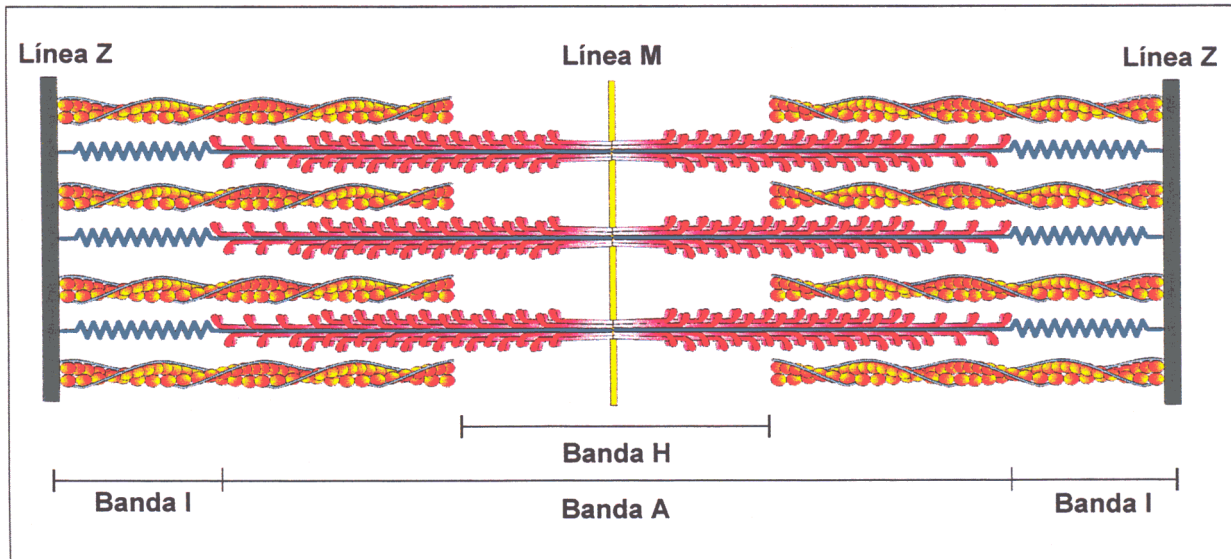


Figura 8.- Esquema de la distribución de los microfilamentos en una sarcómera.

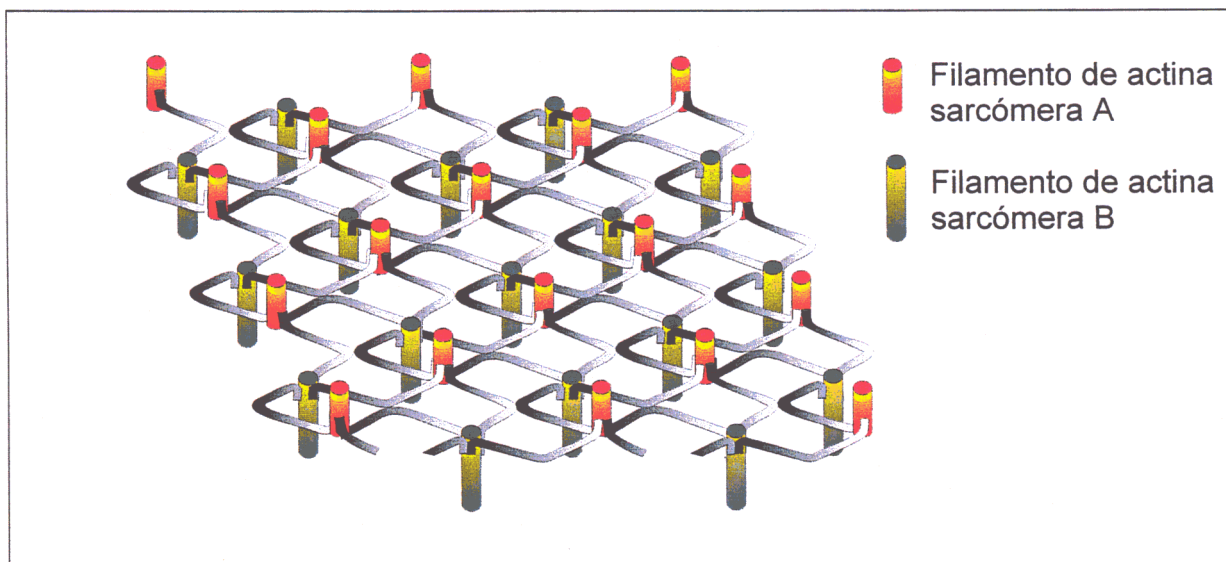


Figura 9.- Representación esquemática tridimensional de la malla cuadrática de proteínas que constituyen la línea Z. Modificado de Yamaguchi y cols. 1985.

ción entre moléculas iguales para formar los filamentos gruesos. Una cadena ligera de cada tipo va asociada a cada cabeza de las cadenas pesadas (Figura 10).

Las enzimas proteolíticas rompen la cadena en varias subunidades: La tripsina la escinde en dos partes, la H meromiosina o meromiosina pesada (MHC) y la L meromiosina o meromiosina ligera (MLC) (Szent-Györgyi, 1953). La MHC es fragmentada por la papaína en dos segmentos: S2 y S1. La MLC y el segmento S2 forman el mango y el segmento S1 la cabeza (Kominz y cols., 1965). Los segmentos S1 representan los lugares activos de unión con la actina y poseen la actividad ATPásica necesaria para la hidrólisis del ATP (Lowey y cols., 1969).

Alrededor de trescientas moléculas de miosina II se unen para constituir un filamento grueso. Su porción lineal se extiende paralelamente al eje mayor del filamento. Poseen un decalaje, cada una en relación con la siguiente y están orientadas de tal manera que el segmento S1 se encuentra siempre en posición distal en relación a la estría M. Los segmentos S1 que corresponden a las expansiones laterales de los filamentos gruesos adoptan una disposición helicoidal alrededor del eje del filamento (Lowey y cols., 1969; Schiaffino y Reggiani, 1996) (Figura 10).

La **actina** se presenta en los filamentos finos bajo la forma de una actina fibrosa (actina F) (Straub, 1942), constituida por dos cadenas longitudinales enrolladas en hélice α , con un diámetro de 8nm. Cada una de estas cadenas es el resultado de la yuxtaposición de los monómeros de moléculas de actina globular (actina G). Cada molécula de actina G (Pm 70 kDa), que en el músculo pertenecen a las actinas de clase α , tiene forma esférica, miden 5,6 nm de diámetro y se polimerizan con la misma orientación espacial, lo que le da al filamento una polaridad definida. Su extremo "más" se encuentra fijo al disco Z por una molécula de α -actinina (Lu y cols, 1992) y su extremo "menos" se extiende hacia el centro de la sarcómera. La doble hélice de actina F está asociada a otras proteínas fibrilares constitutivas del filamento fino (Blanchard y cols., 1989). (Figura 11).

Tanto el mantenimiento de su disposición ordenada, como las relaciones que establecen estos dos tipos de filamentos durante la contracción, dependen directamente de un grupo de proteínas asociadas a ellos, entre las que se encuentran las siguientes:

La **tropomiosina** (Pm 70 kDa) se presenta bajo la forma de filamentos de 40 nm de longitud, constituidos por un dímero de dos cadenas idénticas enrolladas en hélice α , estos filamentos se polimerizan entre sí para formar estructuras mas largas que se localizan en la garganta de la doble hélice de actina (Rowe, 1964), en toda su longitud, proporcionándole estabilidad y consistencia. Entre las funciones que se van conociendo de esta molécula está la cooperación con la α -actinina para unirse al extremo "mas" de los filamentos de actina en las proximidades de la linea Z y la atracción de las moléculas

de miosina II a las zonas donde se están formando las miofibrillas, y en las fibras maduras, el bloqueo de los lugares activos para la miosina a lo largo del filamento de actina. Cada molécula de tropomiosina tiene siete regiones de secuencias homólogas espaciadas regularmente. Se cree que cada una de estas secuencias se une a un monómero de actina (Phillips y cols, 1986) (Figura 11).

La **troponina**, formada por un complejo de tres proteínas (Pm 78 kDa), se encuentra repartida a intervalos regulares de alrededor de 40 nm a lo largo de la actina de manera que cada molécula de tropomiosina está asociada a un complejo de troponina. El complejo de troponina está constituido por tres subunidades, la troponina T (Pm 30 kDa), responsable de la localización espacial del complejo por su unión a la molécula de tropomiosina, la troponina I (Pm 30 kDa), que inhibe la interacción de la actina y miosina, y la troponina C (Pm 18 kDa), fijadora de Ca^{2+} en cuya presencia se favorece la interacción entre los dos tipos de miofilamentos. (Palmer y Kentish, 1994; Szczesma y Fajer, 1995), (Figura 11).

La **tropomodulina** (43kDa.) es una proteína de capucha para los extremos de los filamentos de actina, necesaria para mantener la longitud del filamento. En el músculo estriado, una molécula de tropomodulina está asociada al extremo libre de la actina, opuesto a la línea Z (Fowler y cols., 1993).

La **nebulina**, proteína muy grande que varía en tamaño según las especies. En el hombre tiene un Pm de 890 kDa. y una longitud de 1,3 μm . Está presente en el músculo esquelético pero no en el cardíaco. Aparece como un polipéptido sencillo, formado por una secuencia repetida de treinta y cinco aminoácidos que no muestran semejanza con otras proteínas conocidas (Wang y Wright, 1988). Dos filamentos de nebulina se extienden a lo largo de cada filamento de actina entre sus dos extremos, de forma que actúan como moduladores de su longitud. Presentan una estructura en hélice α que es probablemente estabilizada por la interacción con la actina: los módulos de 35 aminoácidos, miden lo mismo que las posiciones repetidas de los filamentos delgados, de forma que cada uno se relaciona con siete moléculas de actina, una de tropomiosina y un complejo de troponina. El extremo COOH-terminal, está unido al disco Z, interactuando con la α -actinina (Pfuhl y cols., 1994) (Figura 12).

En relación con los filamentos gruesos de miosina, encontramos también una serie de proteínas asociadas (MBP), entre ellas la proteína C, proteína H, proteína X, proteína M y miomesina. Se caracterizan por tener una forma similar a las moléculas de inmunoglobulinas o fibronectinas, con dos dominios que permiten relacionar entre sí dos estructuras diferentes. Estas proteínas se localizan en puntos concretos dentro de la banda A, colaborando en el mantenimiento de la posición de los filamentos de miosina entre sí, en relación con el filamento de titina y periféricamente con otras proteínas del citoesqueleto (Epstein y Fischman, 1991).

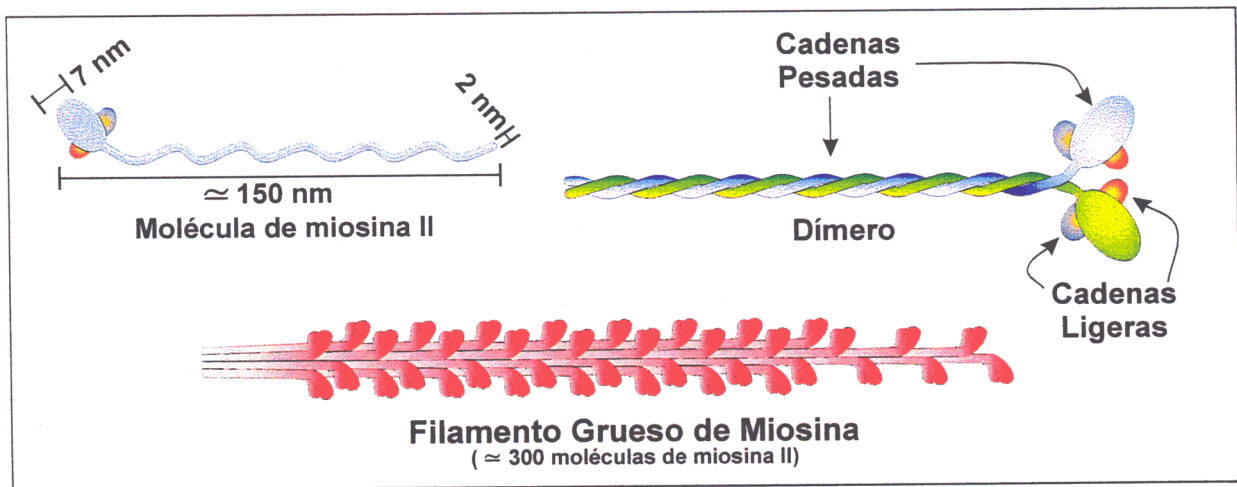


Figura 10.- Representación esquemática del microfilamento de miosina y sus componentes moleculares.

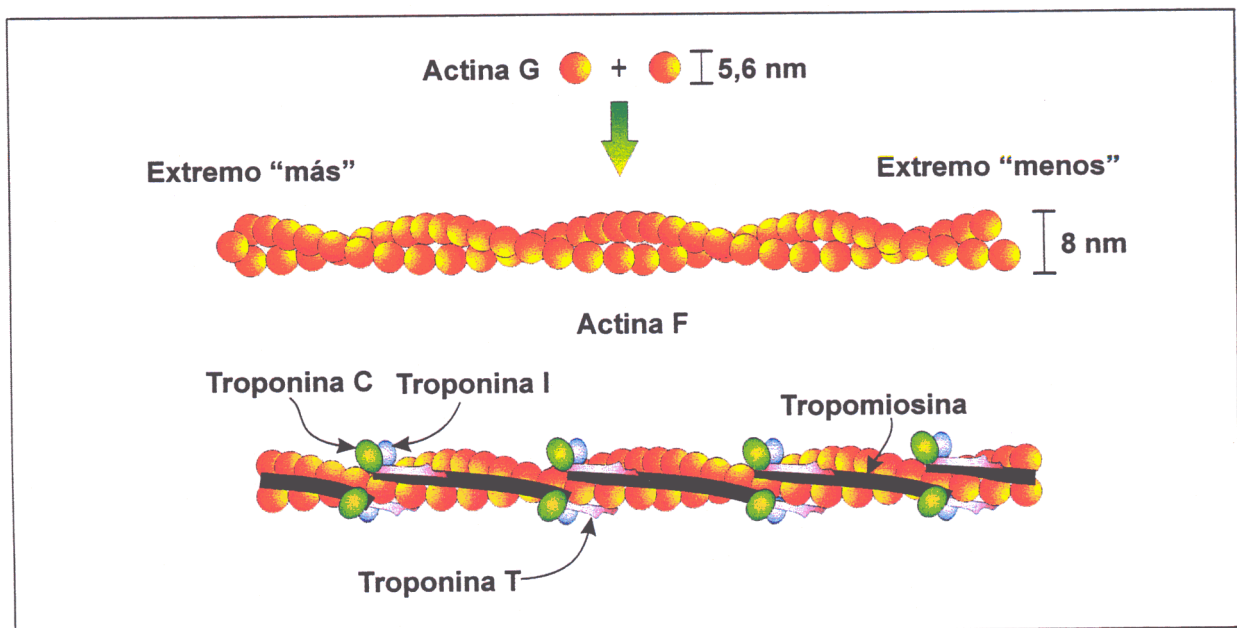


Figura 11.- Representación esquemática del microfilamento de actina y sus componentes moleculares.

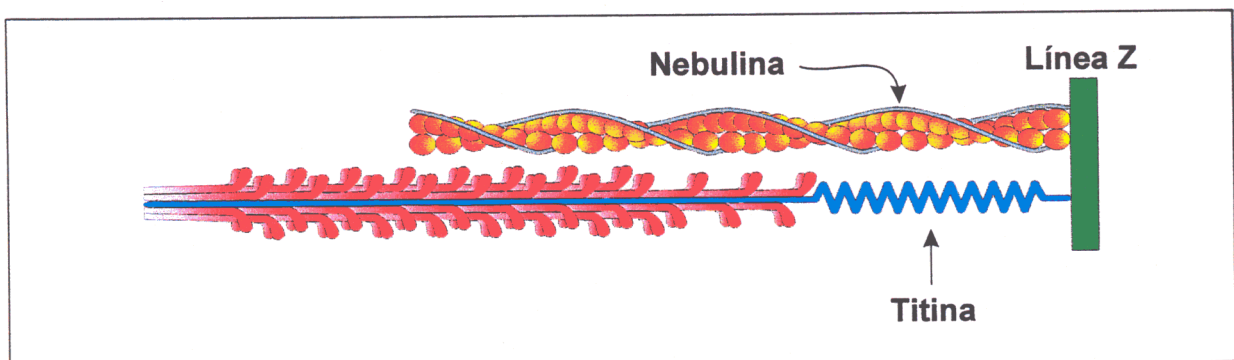


Figura 12.- Moléculas de nebulina y titina asociadas a los microfilamentos y su localización en la sarcómera.

Hay 11 bandas transversas en la zona A, localizándose dos o tres moléculas de **proteína C** (140 kDa) desde la 5 a la 11, a una distancia de 43 nm entre ellas y presentan lugares de unión para miosina y titina (Fürst y cols., 1992). La **proteína X** (145kDa), se localiza en las bandas 3 y 4 y parece corresponder a una isoforma de la proteína C. La **proteína H** (74 kDa), se localiza entre la banda 3 y la línea M y una proteína similar se ha localizado en la banda 9, en la mitad de la zona A, coexistiendo con la proteína C. La **proteína M** (165 kDa) y la **miomesina** (185 kDa), posiblemente son isoformas del mismo compuesto. Se localizan a nivel de la línea M y junto con la creatín quinasa (CK) muscular en esta misma localización, es responsable de la variabilidad estructural que aparece en la línea M. En el extremo libre de los filamentos gruesos, a nivel de la unión de las bandas A-I, existe moléculas de AMP-deaminasas que se unen a miosina y titina (Vaughan y cols., 1993).

La **titina** o **conectina**, es una molécula de gran tamaño (2.500 a 3.000 kDa), tiene una estructura fibrilar y se extiende a modo de cuerda desde el disco Z hasta los filamentos gruesos introduciéndose como eje longitudinal central de los mismos sin llegar a ocupar la línea M. La porción de la molécula que se encuentra en la banda I es elástica, mientras que la porción incluida en la banda A es rígida, manteniendo los filamentos de miosina centrados en la sarcómera (Bennett y cols., 1997). Se une a la miosina en su porción MHC, a través de moléculas de proteína C. El extremo COOH-terminal está unido a la proteína M y miomesina.

A nivel de la línea Z, como lugar de anclaje de una parte de los filamentos de la sarcómera, también se han aislado e identificado proteínas concretas. La α -**actinina** (100 kDa) es un homodímero de subunidades alargadas en orientación antiparalela y de estructura similar a la espectrina y distrofina (Blanchard y cols., 1989). La β -**actinina** o proteína Cap-Z (36 kDa) es una proteína de capucha para el filamento de actina a nivel de la línea Z (Schafer y cols., 1994). Además hay otras proteínas en estudio, como la amorfina, tensina, proteína Z, eu-actinina, Z-nina, etc, de las que todavía no se saben si son asociaciones enzimáticas para el trabajo o productos de degradación de las demás proteínas (Vigoreaux, 1994).

Existen además una serie de proteínas que asocian estas estructuras entre sí y con otros elementos celulares, entre ellas destacaremos la desmina y la vimentina, que unen paquetes de miofibrillas contiguos a nivel de la línea Z (Lazarides, 1980; Tokuyasu y cols., 1983) y la esquelemina y la distrofina que une las miofibrillas, a nivel de la línea M con proteínas relacionadas con la membrana plasmática (Price y Gomer, 1993).

Cada una de estas proteínas, presenta variaciones concretas en sus moléculas, que dan un carácter propio a cada tipo de fibra muscular, condicionando su relación con el resto de proteínas de la célula y con el microambiente, por supuesto su función. Cada una de estas moléculas o isoformas, están codificadas por familias de genes

estrechamente relacionados entre sí y que están siendo estudiados por numerosos grupos de investigadores. Nosotros profundizaremos en este punto al tratar la heterogeneidad de las fibras musculares extrafusales.

2.2.2.3.- Sarcolema.

El sarcolema fue el termino empleado por Bowman en 1840, para denominar la envoltura superficial de la fibra muscular, visible a microscopía óptica. Estudiada con microscopía electrónica se ha demostrado que este sarcolema es el resultado de la yuxtaposición de la membrana plasmática, el plasmalema, en la parte interna y una lámina basal que la recubre externamente. Las dos capas están íntimamente aplicadas una a la otra (Mauro y Adams, 1961; Bonilla, 1983) (Figura 13a).

La lámina basal es la parte mas externa de la fibra muscular y es segregada por la célula muscular misma. Mide 30-50 nm y está compuesta por dos capas de diferente densidad electrónica. la lámina lúcida y la lámina densa, externa a la anterior. La lámina densa está compuesta por glucoproteínas y una variedad de proteínas estructurales incluyendo colágeno tipo IV, mientras que la lámina lúcida esta integrada fundamentalmente por fibronectinas, entactinas y lamininas (Duance y cols., 1980; Stephens y cols., 1982; Hall y Enver, 1994). Esta última proteína está más concentrada en la porción de la lámina basal en contacto con la terminación axónica que inerva la fibra muscular (Moscoso y cols. 1995; Iglesias y cols. 1995). Externamente a esta lámina basal aparece una capa denominada reticular compuesta por colágeno, en particular del tipo I y III (Dunn y cols., 1984), proteoglicanos y fibronectina. Este retículo está segregado por el tejido conjuntivo adyacente a la fibra muscular y está poco desarrollado en el músculo normal.

El plasmalema es el recubrimiento eléctricamente excitable de la fibra y está compuesto por una bicapa lipídica y una variedad de proteínas metabólicamente activas que actúan como receptores. En ella aparecen invaginaciones que penetran hacia el interior de la célula y forman un sistema de túbulos transversos (túbulos T), rodeando las miofibrillas a nivel de la unión de las bandas A e I y en estrecha relación con el retículo sarcoplásmico.

La estructura macromolecular del plasmalema no es todavía completamente conocida, pero la distribución de las proteínas en la bicapa lipídica ha sido bien estudiada por técnicas de criofractura, revelando las proteínas integrales como partículas intramembranas o en las depresiones de ambas caras de la membrana. Variaciones en esta distribución han sido estudiadas en relación con el desarrollo, función fisiológica y estados patológicos (Shotton, 1982). Las mismas técnicas revelan pequeñas cavidades e invaginaciones, particularmente abundantes en el lado protoplásmico. Este fenómeno tiende a ser mas frecuente a nivel de las bandas I

(Bennett, 1960). Con microscopio electrónico de transmisión las cavidades aparecen como pequeñas y numerosas vesículas a lo largo de la superficie interna de la membrana plasmática. Son continuas con esta membrana y se abren al espacio extracelular. En estas invaginaciones se han caracterizado proteínas como la distrofina y la α -1 sintrofina, sobre todo en zonas próximas a la presencia de mitocondrias (Wakayama y cols., 1997). La distribución de proteínas que ponen en contacto la cara interna de la membrana plasmática con el citoplasma, han llevado a Muñoz y cols. (1995) a determinar la existencia de subcompartimentos en el sarcolema, todos ellos con formación de caveolas (Figura 13b), y así hablan de una fracción sarcolémica 1, caracterizada por presentar receptores para β -1-integrina, caveolina y clatrina, igual que la fracción de túbulos T, mientras que la fracción sarcolémica 2 presenta receptores para β -1-integrina y distrofina, menor número para caveolina y casi ninguno para clatrina.

Se han descrito otras proteínas del citoesqueleto asociadas al plasmalema, como la vinculina y unas proteínas espectrina-like asociadas o no a subunidades de α -fodrina en distintos dominios del sarcolema (Porter y cols., 1997). La vinculina (Pm 130 kDa), está presente como una estructura ortogonal, cuya banda transversa llamada costámero, se sitúa encima de la banda I (Figura 14). Los costámeros están divididos en dos partes por la línea Z, pero la vinculina no está presente sobre esta línea. Se ha sugerido también que los costámeros están físicamente enganchados con las miofibrillas (Pardo y cols., 1983). Mediante estudios inmunocitoquímicos, se ha demostrado que varios anticuerpos contra determinantes β -espectrina, están asociados con el plasmalema del músculo esquelético humano (Appleyard y cols., 1984) y a las líneas Z (Ehmer y cols., 1997). Mondello y cols (1996), han llegado a determinar 10 proteínas diferentes en los costámeros, utilizando técnicas inmunocitoquímicas e indican que los costámeros también están en relación con la línea M.

No obstante la morfología del sarcolema muestra variaciones de esta descripción dependiendo de la especialización de algunas regiones del músculo, como veremos al hablar de la unión miotendinosa, unión neuromuscular y relaciones con las células satélites.

2.2.2.4.- El sarcoplasma y sus componentes.

La mayor parte del citoplasma de la célula muscular está ocupado por las miofibrillas. El citoplasma restante o sarcoplasma contiene el resto de los elementos celulares:

El retículo endoplásmico liso o **retículo sarcoplásmico (RS)**, cuya existencia fue ya reconocida por los antiguos autores (Veratti, 1902), aparece al microscopio electrónico bajo la forma de una compleja red de canales distribuidos alrededor de las

miofibrillas (Bennett y Porter, 1953). Las formaciones membranosas, agranulares que lo componen son de tres tipos (Andersson-Cedergren, 1959): a.- Cisternas aplanadas o cisternas terminales de 40 a 100 nm de longitud; están dispuestas transversalmente en el hombre, existiendo dos, una a cada lado del tubo T que se encuentra en esa misma localización, a nivel de la unión entre bandas A e I, por lo tanto se cuenta dos pares por sarcómera. b.- Tubos longitudinales que recubren la banda A y conectan las cisterna terminales. Miden de 30 a 60 nm de diámetro. A la altura de la zona H, los tubos se anastomosan entre sí, formando una red irregular de sáculos aplanados, los sacos H de 25 a 30 nm de grosor. c.- Tubos longitudinales que conectan cisternas terminales a nivel de la banda I (Figura 15).

Esta configuración específica del RS, parece ser conductiva para los cambios bioquímicos del espacio interfibrilar que acompañan a la contracción. Una gran parte del calcio está concentrado en las cisternas terminales bajo la forma de cristales de oxalato, detectables al microscopio electrónico por su electrodensidad. La cantidad de calcio contenido en esta localización, varía atendiendo al tipo de fibra de que se trate, como veremos más adelante (Fryer y Neering, 1986).

Entre las dos cisternas transversales de un mismo par, se encuentra el túbulo T, procedente de la invaginación del sarcolema, de diámetro muy pequeño y que comunica directamente con el espacio extracelular, la forma del túbulo T parece que se mantiene gracias a la presencia de proteoglicanos en su matriz extracelular (Davis y Carlson, 1995; Dell'Orbo y cols., 1995). En un corte longitudinal, la asociación de los tres elementos forma una figura característica: la triada (Franzini-Armstrong, 1971). Estos túbulos son opacificados después de la inyección de ferritina, contrariamente a los del RS (Hill, 1964). Cada túbulo T está en continuidad con los elementos homólogos situados en un mismo plano transversal. El conjunto define el sistema T. Esta localización precisa y constante de las triadas sobre la zona A-I de las sarcómeras hace pensar en la existencia de un sistema de anclaje entre ambos elementos celulares (Takekura y cols., 1996). En la proximidad de la membrana plasmática la pared del túbulo transversal es lisa; por el contrario, en contacto con las cisternas transversales presenta pequeñas densidades (pies) regularmente repartidos. Esta modificación estructural tiene lugar a intervalos regulares, poniendo al túbulo T en estrecho contacto con cada una de las membranas de las cisternas contiguas del RS, que se manifiestan con alta resolución, como ligeramente indentadas (Rayns y cols, 1975). La apariencia de estas zonas de aposición, nos recuerdan las "gap-junctions" de las células epiteliales. Esta diferenciación está en relación directa con la localización de la enzima CaATPasa, cuyo papel en el transporte del calcio a través del RS fue aclarado por Martonosi y Beeler (1983). Presenta diferenciaciones entre los distintos tipos de fibras (Dulhunty y cols, 1983) y juega un importante papel en los mecanismos de excitación-contracción (Dulhunty y Valois, 1983). Guo y cols. (1994), han identificado en la cara externa de la membrana del RS a nivel de la cisterna terminal y en relación con el túbulo T, una

proteína integrante de esta membrana de 90 kDa. que muestra clara preferencia por las fibras tipo II del músculo esquelético.

El RS participa en la contracción muscular mediante la regulación de la concentración de iones de Ca^{2+} . Este fenómeno se realiza por la excitación directa de sus paredes a nivel de las cisterna transversales por los contactos focales del túbulo T en el momento de la despolarización de la membrana, de tal manera que la onda se transmite casi simultáneamente a toda la célula.

El sarcoplasma posee **mitocondrias** en abundancia situadas en la zona interfibrilar, donde pueden encontrarse como elementos aislados, dispuestos simétricamente en relación con las líneas Z, o bien alineadas en forma de columna sencilla que corre paralela a las miofibrillas adyacentes de varias sarcómeras. En la zona de la banda I, las mitocondrias pueden verse extendidas transversalmente sobre las miofibrillas, pudiendo adoptar una forma anular, rodeándolas parcialmente (Andersson-Cedergren, 1959). Existen también mitocondrias en abundancia, adyacentes a la membrana plasmática, en las zonas próximas al núcleo, paralelas al eje mayor de la célula, o agrupadas en la región de la placa motora. El número y tamaño de las mitocondrias y la complejidad de sus crestas, varía dependiendo del tipo de fibras como veremos posteriormente. Contienen los enzimas necesarios para el metabolismo activo de las células musculares y se relacionan con la concentración intracelular de calcio.

El **aparato de Golgi**, poco extenso se localiza en la vecindad de los polos nucleares. Existe un tráfico entre esta estructura y el retículo endoplásmico, mediado por microtúbulos (Rahkila y cols., 1997). En la proximidad de los sáculos golgianos se hace patente la presencia de pequeñas vesículas que recuerdan a los lisosomas y gránulos de lipopigmento (Price y cols., 1964).

En el sarcoplasma periférico existen **ribosomas** libres y polirribosomas, sobre todo en las porciones distales de la célula y en la zona de unión neuromuscular, pero son poco numerosos en los polos nucleares. En raras ocasiones se asocian a membranas, pero en condiciones de regeneración, pueden verse íntimamente asociados a filamentos muy finos, supuestamente sintetizados aquí como precursores de los miofilamentos que darán lugar a miofibrillas (Przybylsky y Blumberg, 1966).

El **sarcoplasma fundamental**, repartido entre las diferentes organelas, encierra numerosas sustancias disueltas y elementos figurados. Contiene una fracción compuesta por agua y minerales (Ca, K, Mg, Na, Fe), glúcidos, lípidos y una fracción orgánica donde las proteínas solubles llamadas sarcoplásmicas, tienen un papel preponderante. Los glúcidos existen bajo la forma de glucosa y de glucógeno. Este último se encuentran como partículas β de 25-40 nm de diámetro, diseminadas entre las miofibrillas y en la proximidad de las mitocondrias. Diversas variedades de lípidos están

presentes, como fosfolípidos, glicolípidos y colesterol. Estos se pueden ver en las inmediaciones de las mitocondrias, como pequeñas gotitas lipídicas, de densidad homogénea (Lehninger, 1967).

El músculo estriado es un importante reservorio de aminoácidos (Bennett, 1960) que asumen un papel de suplencia en el caso de ausencia alimentaria. Entre las proteínas solubles, la mioglobina como pigmento respiratorio merece una mención especial. Esta cromoproteína está relacionada desde el punto de vista bioquímico con la hemoglobina (Huxley, 1963). Fija el oxígeno que alimentará secundariamente al sistema de la fosforilación oxidativa (Margossian y Lowy, 1973; Papadopoulos y cols., 1995). Su abundancia en cada célula varía proporcionalmente al condrioma y dependiendo del tipo de fibra (Jansson y Sylven, 1983). Tiene color rojo oscuro, y de su concentración depende la coloración de cada tipo de fibra muscular (Drews y Engel, 1961). Es preciso igualmente recordar la presencia de ATP y fosfágeno, fuentes de energía importantes del músculo estriado.

El citoesqueleto contiene filamentos inmunológicamente distintos al resto de proteínas fibrilares de la célula. Morfológicamente tienen un diámetro de 10 nm, intermedios entre la actina y la miosina. Estos filamentos intermedios identificados en el músculo esquelético, incluyen desmina o esqueletina (Lazarides, 1980; Thornell y cols., 1983) y vimentina (Lazarides, 1980). La desmina (Pm 50 kDa) se ha localizado en la periferia de la línea Z, formando una malla, interconectando eslabones de las miofibrillas, entre ellas y con el sarcolema (Tokuyasu y cols., 1983). Por otra parte, filamentos intermedios parecen también conectar la línea Z con las triadas. Estudios inmunocitoquímicos no han confirmado este hecho, pero han demostrado la presencia de filamentos de desmina conectando la líneas Z con la membrana nuclear (Tokuyasu y cols., 1983). La desmina es prominente en las fibras desarrolladas y en ciertas situaciones de enfermedad (Edström y cols., 1980; Thornell y cols., 1983), pero no es morfológicamente importante en el músculo esquelético adulto normal. Los filamentos intermedios de vimentina (Pm 52 kDa) frecuentemente terminan en la membrana nuclear y también forman conexiones con la membrana plasmática. Estos datos nos sugieren que la vimentina está asociada con los núcleos y puede intervenir en un mecanismo de soporte, pero su papel en el músculo humano no está aclarado en la actualidad (Lazarides, 1980).

2.3.- CÉLULAS SATÉLITES.

Estas células fueron descritas por Mauro (1961) en el músculo tibial anterior de la rana, aunque con muy poca diferencia de tiempo Katz (1961), describe una célula semejante cerca del huso neuromuscular del mismo animal. Pasados diez años Moss y Leblond (1971) le atribuyen un papel destacado durante el crecimiento y posteriormente Snow (1977 a y b) y Lipton y Schultz (1979) evidencian su gran trascendencia en los

procesos reparadores musculares. Este tipo celular se ha puesto de manifiesto en todos los músculos esqueléticos de los vertebrados y en algunos invertebrados, pero no en el músculo cardíaco ni en el músculo liso (Midsukami, 1981).

La célula satélite se encuentra confinada entre la lámina basal y la membrana plasmática de la fibra muscular, asentada en una depresión de dicha fibra y separada de ésta por una zona electro-transparente de unos 15 a 20 nm de anchura, por lo que parece que su núcleo está alineado con los mionúcleos. El contenido de la zona de separación electro-transparente está constituido por proteínas de la lámina basal (Mauro, 1961; Muir y cols, 1965). La mayor parte de las observaciones (Muir y cols, 1965; Schmalbruch, 1978 y Cull-Candy y cols 1980) están en favor de la no existencia de conexiones entre la fibra muscular y la célula satélite (Figura 16 a y b).

En el músculo estriado adulto de los mamíferos esta célula es fusiforme, con unas dimensiones de 25x4x5 μm aproximadamente, presentando expansiones, de alrededor de 40 μm , a un lado y a otro del cuerpo celular. Se encuentran orientadas con su eje mayor paralelo al eje principal de las fibras musculares (Muir, 1970; Mazanet y cols, 1982). Existen grandes diferencias de tamaño relacionadas con la especie animal estudiada (Muir, 1970 y Campion, 1984). Según observaciones de Schmalbruch y Hellhammer (1977), más de la mitad de las células satélites están acompañadas en su proximidad de un capilar. Aunque la mayoría de los autores indican esta orientación paralela a las fibras, hay trabajos experimentales que nos hablan de una situación oblicua (Konigsber y cols, 1975) y hasta transversal (Chou y Nonaka, 1977).

En cuanto a su ultraestructura, difiere notablemente dependiendo del estado metabólico. En fase de reposo, el núcleo presenta una morfología oval, con unas dimensiones de 10-15x2-5x1-3 μm . Es heterocromático y con dos centriolos (Venable, 1966; Hess y Rosner, 1970; Ontell, 1974; Ishimoto y cols, 1983). Su relación núcleo-citoplasma es muy elevada ya que éste último es poco abundante, conteniendo un aparato de Golgi y retículo endoplásmico poco desarrollados, así como algunas pequeñas mitocondrias y escasos ribosomas, lisosomas y microfilamentos de 10 nm de diámetro (Campion, 1984) (Figura 17).

Esta misma célula en estado activado, como por ejemplo en el período perinatal, presenta grandes diferencias ultraestructurales (Schultz, 1976). La morfología es muy semejante al fibroblasto. El espacio electro-transparente que le separa de la fibra muscular aumenta hasta 60 nm. La cromatina nuclear está mas dispersa. En cuanto al citoplasma, nos muestra un retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi bien desarrollados y gran cantidad de ribosomas. Se han descrito microtúbulos que eran reemplazados progresivamente por microfilamentos de 10 nm de espesor (Przybylski, 1971 y Lipton, 1977). Esta misma configuración morfológica también ha sido descrita en los procesos traumáticos, patológicos e irritativos del músculo (Snow, 1977a; Mastaglia

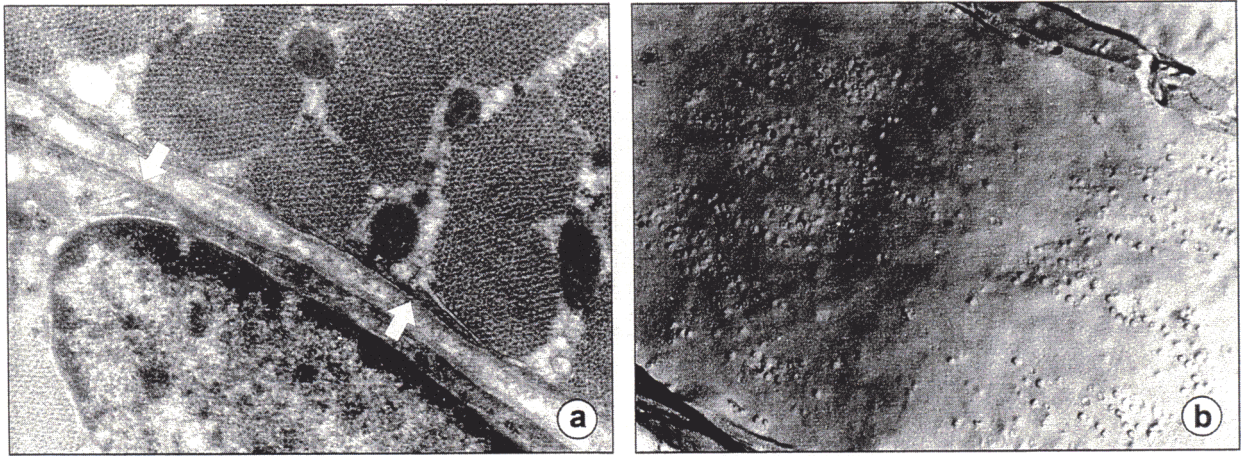


Figura 13 a y b.- En la imagen de la izquierda apreciamos el sarcolema, yuxtaposición de la membrana plasmática y la lámina basal (MET. 10000x). Derecha, caveolas situadas en la región de la banda I (MEB. 14500x), tomado de Zhang y Shafiq, 1985.

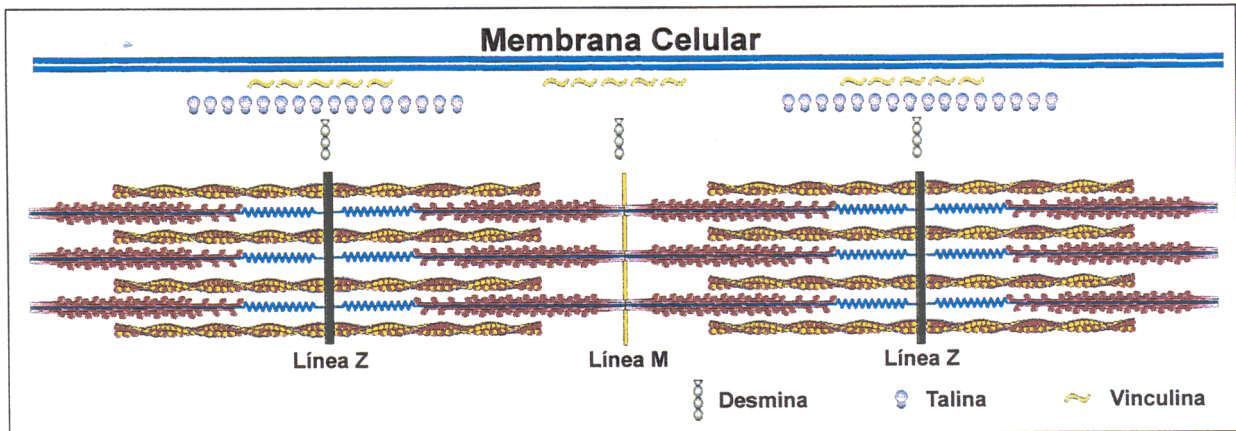


Figura 14.- Distribución esquemáticas de las proteínas constitutivas del costámero y su localización en la fibra muscular estriada esquelética.

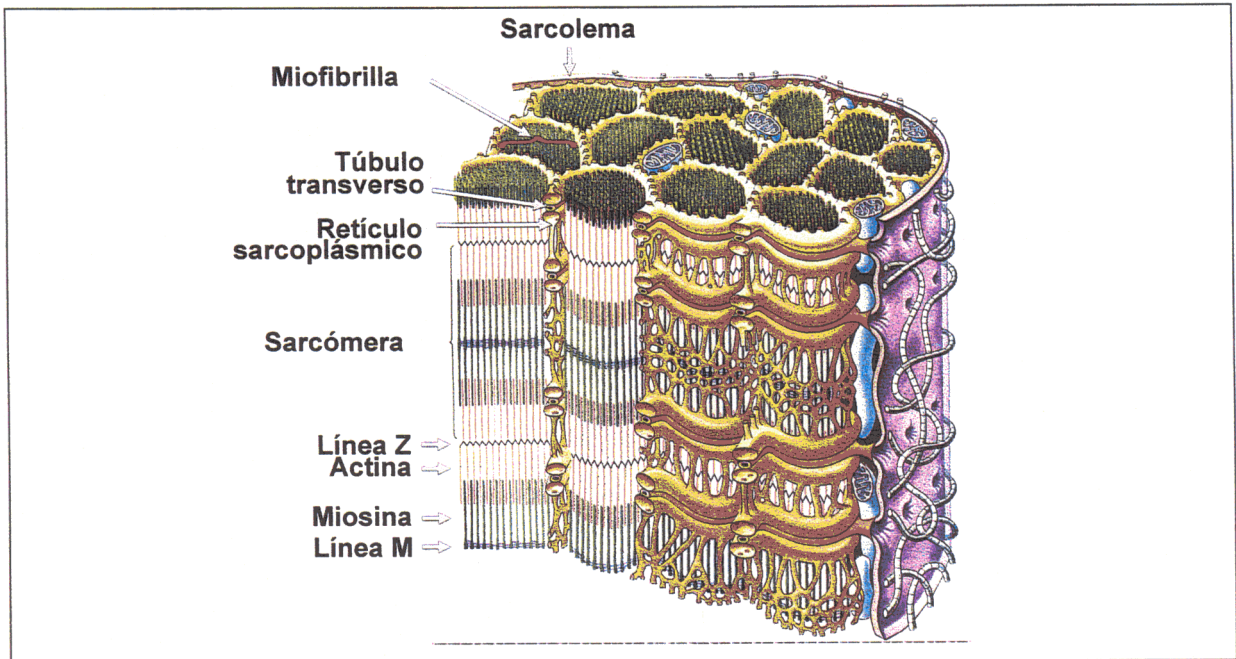
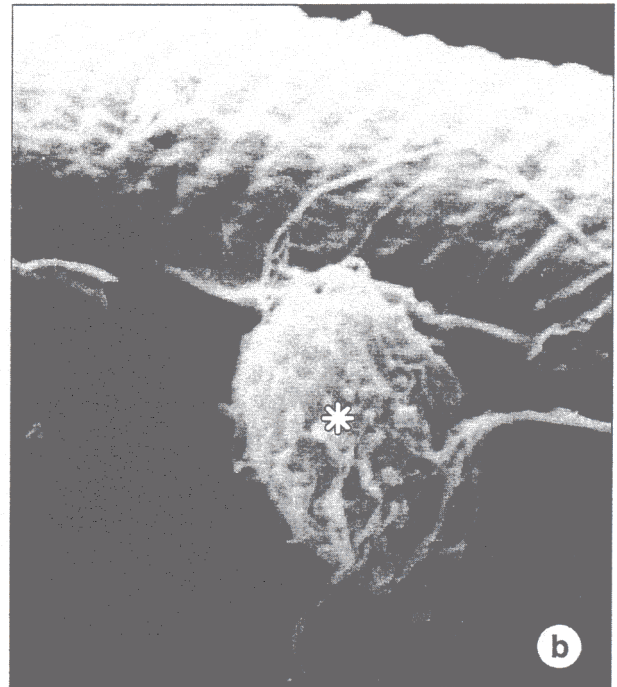
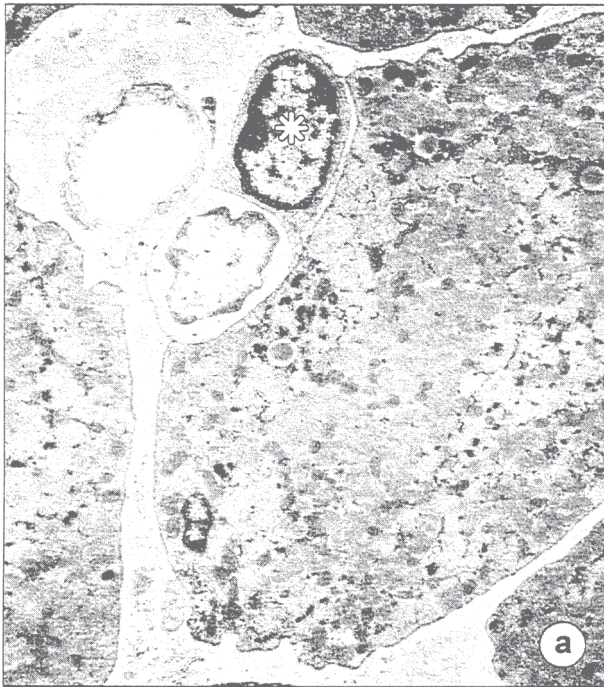


Figura 15.- Reconstrucción tridimensional de músculo esquelético mostrando la organización de miofibrillas, mitocondrias y sistema de membranas. Modificado de Williams y Warwick, 1985.



Figuras 16 a y b.- Corte transversal de una fibra muscular, en la parte superior podemos observar una célula satélite claramente separada de la anterior. MET. 3300x. Imagen derecha, microfotografía electrónica de barrido de una célula satélite, tomada de Bischoff, 1986, 5000x.

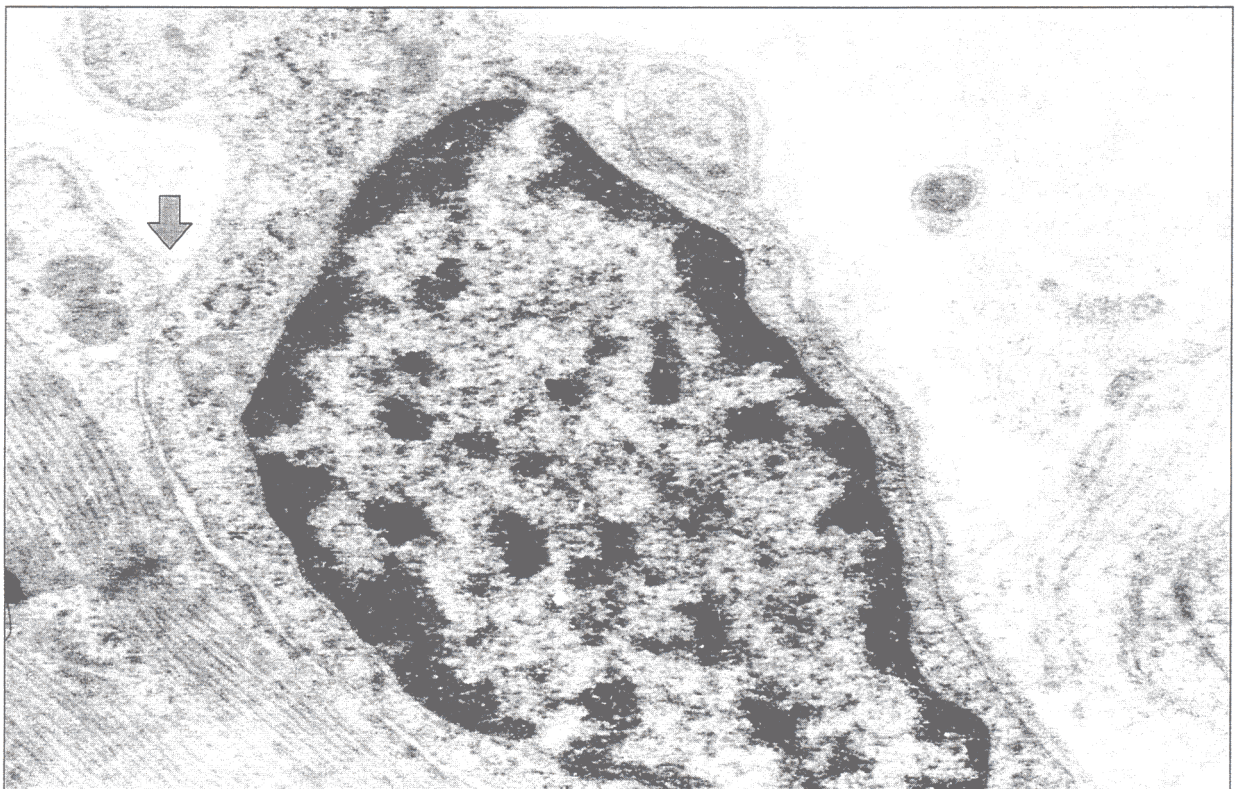


Figura 17.- Célula satélite. Apréciase su elevada relación núcleo/citoplasma. En este último, pueden verse algunas mitocondrias y ribosomas. Lámina basal común y membranas celulares independientes. (➡) MET. 20000x.

y cols, 1970 a y b; Wakayama y cols, 1979; Hess y Rosner, 1970; Murray y Robbins, 1982a y b). Estos autores han sugerido que la irritación de las fibras musculares, entrañaría la liberación de sustancias mitógenas que estimularían específicamente a las células satélites e intersticiales. Bischoff (1983) comprueba que extractos de músculo adulto, pueden estimular la proliferación de células satélites en cultivo, de la misma forma que lo hacen los extractos embrionarios, y Phelan y Gonyea (1997), comprueban como la irradiación puede frenar su proliferación o diferenciación.

En cuanto al número de estas células, parece que existe un criterio uniforme de todos los autores, considerando que viene a ser de aproximadamente 80 por mm (Ennesco y Puddy, 1964; Widdowson, 1970; Moss y Leblond, 1971; Layman y cols, 1980). La frecuencia de estas células es mayor en los músculos lentos que en los rápidos (Aloisi y cols, 1973; Schmalbruch y Hellhammer, 1977; Kelly, 1978). Milward (1980) basa esta diferencia en una concentración mas elevada en RNA y en un recambio más rápido de las proteínas. Schultz en 1974 propone una formula para calcular su número, pero posteriormente Gibson y Schultz (1982) y estos mismos autores (1983), desarrollan otro método de cálculo, basado en el cambio de densidad de los mionúcleos. Las células satélites están presentes durante toda la vida del individuo (Gutmann y Hanzlikova, 1972; Schmalbruch y Hellhammer, 1976), disminuyendo su número con la edad hasta que el músculo alcanza su talla adulta (Moss y Leblond, 1971). Recientemente Decary y cols. (1997), han demostrado que la capacidad proliferativa y la longitud de los telómeros de estas células disminuye durante las dos primeras décadas, mientras que los mionúcleos permanecen estables ya que la longitud de los telómeros es constante durante toda la vida. Mozdziak (1994), utilizando métodos inmunocitoquímicos, determina que existen $5,0 \pm 1,4$ núcleos de células satélites por cada 1000 núcleos de células musculares.

Aunque por los trabajos de Armend y cols (1983), sabemos que su origen es somítico, no se ha podido establecer todavía su línea de evolución. Las tres hipótesis propuestas son: 1) Que sean mionúcleos diferenciados, que se han separado de la fibra por un proceso de segregación de la membrana. 2) Que sean una subclase especial en la línea miogénica y que tengan un precursor común con los mioblastos embrionarios. 3) Que sean mioblastos, presumiblemente embrionarios cuya diferenciación está suspendida bajo la influencia de ciertos factores del desarrollo. Esta última hipótesis es la que mas partidarios posee (Yaffe y Saxel, 1977; Cossu y cols, 1980; 1982; Jones, 1982).

El camino emprendido en la actualidad para profundizar en este punto, lleva los pasos de los investigadores a estudiar la caracterización de sus proteínas, en reposo y en procesos de regeneración (Gorza, 1990). En distintos tipos de vertebrados, las fibras en regeneración expresan isoformas de miosina propias de momentos concretos del desarrollo, similares a las que expresan los mioblastos fetales (Düsterhoft y Pette,

1993), Tanto en los músculos rápidos como en los lentos, durante el proceso de regeneración, las células satélites solo expresan miosinas rápidas (Edom y cols. 1994), y solo expresan formas lentas, cuando tienen contacto con una fibra muscular (Esser y cols. 1993).

2.4.- VASCULARIZACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

Las ramas de la arteria principal más próxima entran, junto con el nervio, a lo largo de una zona de posición constante, el hilio neurovascular. Suelen existir arterias subsidiarias, que entran cerca de los extremos del músculo. En el perimysio se dividen en arterias de menor calibre y arteriolas, para terminar en capilares en el endomisio, que corren paralelos a las fibras musculares, presentando frecuentes anastomosis transversas que forman un enrejado tridimensional (Figura 1). Este lecho vascular es mucho más denso a nivel de las fibras rojas (Zweifeach y Metz, 1955).

El suministro y drenaje del lecho capilar ha sido objeto de controversias. Estudios fisiológicos utilizando como trazador sodio radiactivo (Barlow y cols, 1961) y exámenes microscópicos (Grant y Payling Wright, 1968), indican que hay dos circulaciones distintas en el músculo esquelético: Una vía nutricia, que proviene de la arteria principal y pasa a través del lecho capilar antes de ser recogida por las vénulas y venas para abandonar de nuevo el músculo por el hilio (Eriksson y Myrhage, 1972). La otra vía llamada no nutricia, es una vía alternativa, en la que parte de la sangre pasa a las arteriolas del epi y perimysio, lugares en los que existen pocos capilares, pero si abundantes anastomosis arteriovenosas, de modo que una gran parte de la sangre vuelve al torrente venoso sin pasar por los capilares (Tilton y cols, 1979; Mazanet y Franzini-Armstrong, 1982). Este camino se utiliza cuando se bloquea el flujo sanguíneo en el lecho capilar endomisial, durante la contracción muscular (Holley y Fahim, 1983).

La superficie de contacto entre los capilares y las fibras musculares, se ha propuesto como una medida del flujo de oxígeno entre músculo y sangre (Hepple, 1997). Según los trabajos de Ahmed y cols., (1997), el aporte capilar esta de acuerdo con el tamaño de la fibra muscular y es relativamente independiente del tipo de fibra.

El drenaje linfático comienza en los capilares linfáticos de las vainas de epimisio y perimisio y convergen en los linfáticos mayores, que acompañan a las venas, para abandonar el músculo.

2.5.- INERVACIÓN DEL MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO.

Cada músculo esquelético recibe uno o más nervios, dependiendo de su localización anatómica y de su disposición segmentaria. Después de dividirse en varias ramas pequeñas, el nervio penetra en el músculo por un lugar cercano a su inserción

menos móvil, y junto con los principales vasos sanguíneos entra en una pequeña región oval alargada, el hilio neurovascular, cuya situación es bastante constante en cada músculo (Coers y Woolf, 1959).

Cada nervio contiene tanto fibras motoras como sensitivas. Estas últimas comprenden las fibras mielínicas que regresan de los husos musculares, de las terminaciones sensitivas neurotendinosas y de las aponeurosis, así como aferentes dolorosas no mielinizadas de origen incierto. Las fibras motoras son también muy variadas, comprendiendo las eferentes mielínicas grandes de las motoneuronas del asta anterior de la médula (eferentes α) que inervan las fibras extrafusales, las pequeñas mielínicas (eferentes γ) que se dirigen a los husos musculares y las eferentes autonómicas finas, amielínicas, que inervan el músculo liso vascular.

El nervio se divide dentro del músculo en un plexo, que discurre por los tabiques epi y perimisial, antes de introducirse en el endomisio. En este lugar, se ramifican las eferentes α , repartiendo sus terminales entre un número variable de fibras musculares individuales. Estos terminales, que pierden aquí su vaina mielínica, se distribuyen en una banda transversa estrecha, cerca del centro del músculo, al tiempo que algunas de las aferentes inervan los husos musculares, a menudo en la misma región. Las fibras autonómicas se ramifican en el endomisio a través de todo el músculo, para inervar los vasos. Las terminaciones de los axones motores somáticos se apoyan sobre las fibras musculares individuales, en forma de una estructura especializada, la placa motora, que describiremos posteriormente.

Investigaciones fisiológicas han demostrado, que las fibras musculares inervadas por una neurona motora, están ampliamente esparcidas por el músculo de manera que, incluso cuando solo unas pocas unidades motoras son activas, la fuerza se genera de forma difusa (Burke y Tsairis, 1973). Se ha demostrado así mismo que cada axón termina en un territorio redondeado u oval con una considerable superposición entre las zonas adyacentes de inervación (Sissons, 1969).

2.5.1.- Unión neuromuscular.

Estas estructuras especializadas que constituyen la unión entre la terminación de los nervios motores y la superficie de la fibra muscular, fueron descritas por Doyere (1840), en los músculos de los invertebrados. Rouget (1862) demostró estas mismas formaciones en los vertebrados, con morfología común a todos ellos y considerándolas individualmente las denominó "placa terminal".

Métodos especiales de impregnación para microscopía óptica, demostraron que el nervio motor pierde su vaina de mielina antes de contactar con la célula muscular (Kühne, 1887; Wagner, 1847), y forma una arborización terminal (Boeke, 1910; Tiegs,

1932). Cada una de estas ramas ocupa unas depresiones en la superficie de la fibra muscular llamada hendidura sináptica primaria (Palade, 1954). Alrededor de esta estructura aparece una acumulación de núcleos de las células de Schwann, que acompañan a las terminaciones nerviosas, así como núcleos del músculo adyacente (Reger, 1954, 1955). Se sospecha la existencia de factores localizados en la matriz extracelular sináptica que serían responsables de esta acumulación nuclear (Brosamle y Kuffler, 1996) (Figura 18).

Estos datos fueron confirmados con microscopía electrónica por Beams y Evans (1953), así como la existencia de invaginaciones de la membrana sarcoplásmica en el fondo de la hendidura primaria, formando estrechos y profundos pliegues denominados hendiduras sinápticas secundarias (Palade, 1954). El axolema y el sarcolema están separados en todos sus puntos por una capa limitante que se continua con la lámina basal (Hall y Enver, 1994) que reviste el resto de la superficie de la fibra muscular (Robertson, 1956) (Figura 19).

Los datos muestran que la porción terminal de las ramas motoras, presentan algunas veces varicosidades o protuberancias terminales que encajan en las hendiduras sinápticas primarias (McMahan y cols, 1972; Korneliussen y Waerhaug, 1973). Observaciones con microscopía electrónica de barrido han revelado que las células de Schwann solo cubren por arriba las arborizaciones terminales, pero no la porción de protuberancias del axón que se internan en las hendiduras primarias. Los extremos de estas proyecciones digitales se unen a la superficie del sarcolema, sellando de esta manera las ramas terminales en las hendiduras (Ogata y Yamasaki, 1984, 1985) (Figura 20).

La anchura de las invaginaciones de las hendiduras sinápticas en su zona apical, es aproximadamente de 50 nm, pudiendo llegar en su profundidad a tener una anchura de 90 nm. De esta manera, el área de la fibra muscular en la unión neuromuscular puede incrementarse 4,5 veces (Andersson-Cedergren, 1959).

El axoplasma en la terminación nerviosa contiene mitocondrias y un elevadísimo número de pequeñas vesículas, idénticas a las vesículas sinápticas que se observan en las sinapsis axodendríticas del sistema nervioso (Robertson, 1956; Reger, 1957; 1958; Palay, 1958; De Robertis, 1958). Estas vesículas son pequeños almacenamientos del neurotransmisor acetilcolina (AcCo) (Castillo y Katz, 1955; 1956) que se liberan por exocitosis en la zona activa de la membrana presináptica, que aparece como especializaciones lineales de la membrana, dispuestas paralelamente a las hendiduras sinápticas secundarias. La membrana que recubre estas crestas y las fisuras del músculo subyacente, contienen una alta concentración de receptores de AcCo (Heuser y Salpeter, 1979), así como una elevada concentración de colinesterasa (Couteaux y Nachmansohn, 1938; Couteaux, 1955; Couteaux y Taxi, 1952) (Figura 20).



Figura 18.- Placas motoras con sus características terminaciones arborescentes. Técnica de Gross-Laurentiew.. 800x.

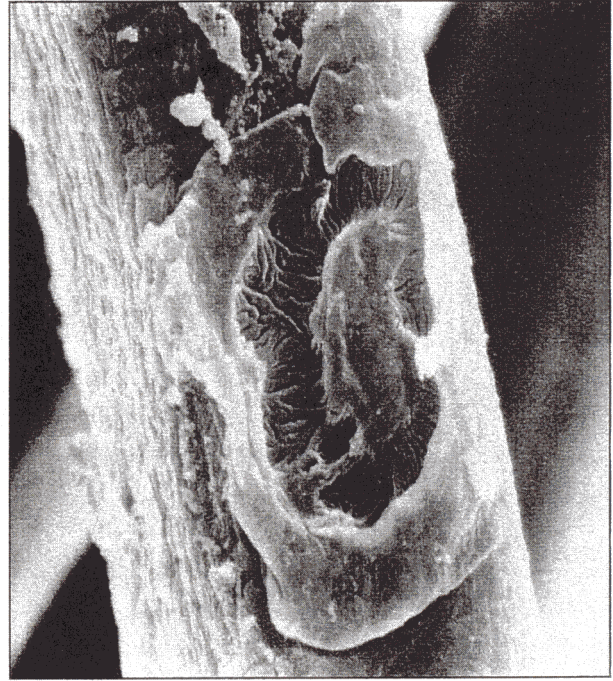


Figura 19.- Imagen de microscopía electrónica de barrido de las hendiduras primarias y secundarias en la superficie de una fibra muscular. 3000x. Tomada de Ogata, 1988.

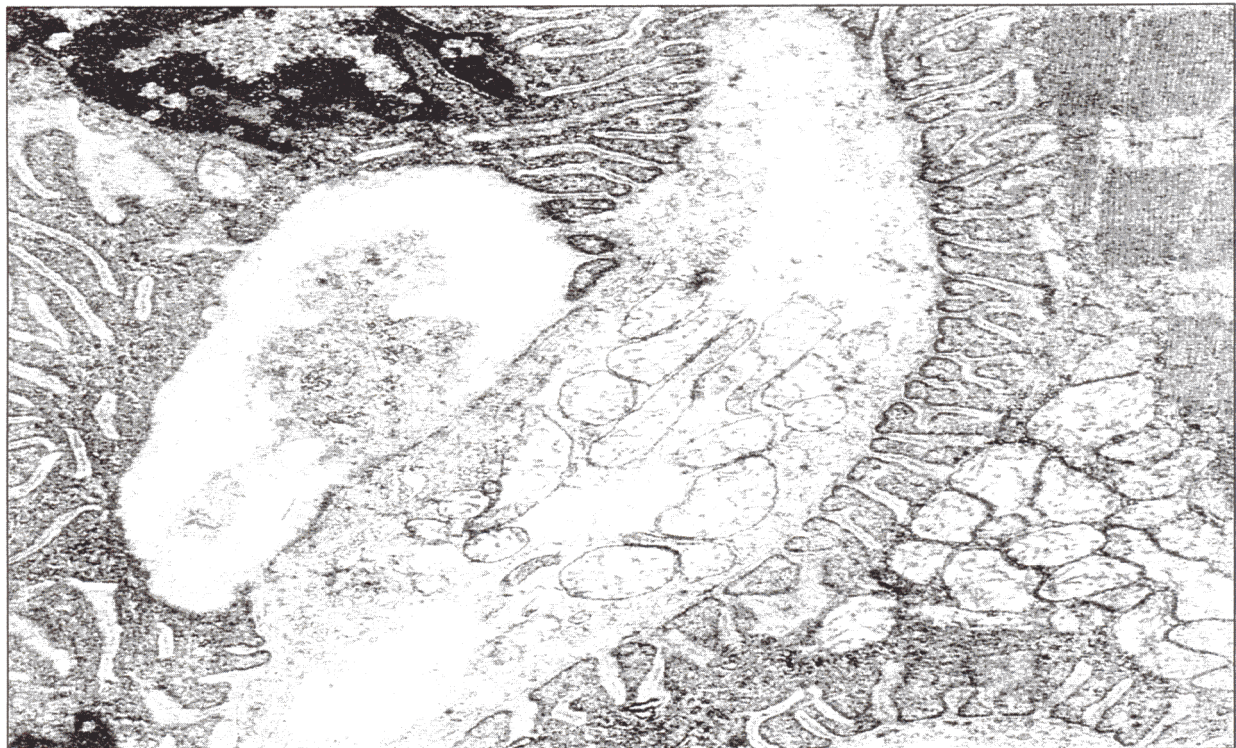


Figura 20.- Micrografía electrónica de una placa motora. Podemos observar la terminación nerviosa alojada en la hendidura primaria con sus correspondientes hendiduras secundarias. 13000x.

Existen características particulares de las placas motoras según el tipo de fibras musculares, como veremos al estudiar este apartado.

2.5.2.- Huso neuromuscular.

Los músculos estriados poseen una innervación aferente, por medio de la cual envían información sobre su grado de contracción al sistema nervioso central. Su grado de integración con impulsos aferentes originados en los tendones, ligamentos y cápsulas articulares, proporciona al individuo información sobre la posición y ritmo de movimiento de las diversas partes de su cuerpo, controlando así la posición de su organismo aun sin la información de los sentidos. Estos receptores aferentes existentes en el músculo se llaman husos neuromusculares (Kühne, 1864) y registran cambios longitudinales de las fibras que lo componen.

Los husos neuromusculares son pequeñas estructuras encapsuladas descritas por primera vez por Weismann (1861), que se encuentran insertadas en sentido longitudinal en los músculos, de tal forma que son estirados cuando estos se distienden. Están diseminados en toda la masa muscular y son más abundantes en aquellos que requieren un control más fino.

Son más anchos en la zona media y afilados en sus extremos, de 3 a 5 mm de longitud y 0,2 mm de diámetro medio. Cada huso está formado por fibras musculares estriadas modificadas, en número variable, de dos a veinte, con sus terminaciones nerviosas asociadas, tanto sensitivas como motoras, así como los vasos sanguíneos que las nutren. La formación completa está encerrada en una vaina que se continua en sus extremos con el tejido conjuntivo del endomisio o del tendón (Merrillees, 1962; Gruner, 1961).

Las fibras musculares que lo forman reciben el nombre de intrafusales y se conocen dos tipos diferentes. Ambas poseen una morfología característica, muy distinta a la de las fibras extrafusales. Unas se denominan fibras en cadena nuclear, que presentan los núcleos de la zona ecuatorial en disposición catenaria y las otras, fibras en saco nuclear por presentar numerosos núcleos acumulados en la zona ecuatorial (Figura 21).

Las fibras en cadena nuclear (Boyd, 1960), llamadas así por la presencia en su región ecuatorial de una o dos cadenas longitudinales, de núcleos groseramente rectangulares, en número de diez a veinte, que se disponen en el centro de la fibra. En las regiones polares siguen manteniéndose en disposición periférica. Su longitud es de unas 11 μm y terminan en extremos afilados, ligeramente por debajo de los polos del huso. Son las más numerosas apareciendo del orden de tres a nueve por huso. Además de los núcleos es interesante comentar otras características que las diferencian de los

demás tipos de fibras, como puede ser la disposición de las miofibrillas, que se encuentran empaquetadas en discretas unidades en el sarcoplasma. La línea M y la estría H aparecen nítidas y bien diferenciadas, pero la estría Z es delgada. Su RS está bien desarrollado a nivel de las bandas I y Z. La triada está generalmente localizada en la unión de la bandas I y A. El sarcoplasma interfibrilar es rico en glucógeno y contiene numerosas y grandes mitocondrias.

En las regiones ecuatoriales y yuxtaecuatoriales del huso, dos o tres fibras en cadena pueden compartir ocasionalmente la misma envoltura endomisial y en algunos puntos, dos células adyacentes pueden presentar regiones de cierre por aposición, compatibles con zónulas adherens (Corvaja y cols, 1967; 1969; Adal, 1969). En estas regiones la lámina basal es común y al corte transversal las dos fibras unidas presentan un contorno oval. Bajo la membrana sarcoplásmica abundan las vesículas de pinocitosis y en la zona central sarcoplásmica se han descrito gránulos limitados por membrana, íntimamente asociados al aparato de Golgi, que Ovalle (1972) apunta como gránulos de secreción.

El segundo tipo de fibra intrafusar, se denomina fibra en saco nuclear (Barker, 1948; Boyd, 1956). En ella aparece una dilatación ecuatorial desprovista de estriaciones, con acumulación de cuarenta a cincuenta núcleos esféricos, que llenan por completo y distienden la fibra. Es la llamada bolsa nuclear. A ambos lados hay una zona que Barker (1948) denominó región de miotubos. Aparecen en menor número encontrando una o dos por huso (Cooper y Daniel, 1956). Su diámetro es mayor que el de las fibras en cadena y también su longitud, con 22 μm , que hace que extiendan sus extremos por fuera de la estructura del huso. La porción extracapsular se continúa con el perimio de las fibras extrafusales o con las fibras de colágeno del tendón.

La disposición de las miofibrillas es diferente según la zona de la célula que consideremos. En las regiones polares aparece muy empaquetadas, formando un haz o manojos, con sarcoplasma muy reducido localizado ocasionalmente a nivel de las bandas I y Z. En la zona comprendida entre el saco ecuatorial y las zonas polares, región de los miotubos, las miofibrillas disminuyen, con estrías Z muy marcadas, pero con bandas H menos definidas y una línea M ausente o representada por dos delgadas líneas paralelas, separadas por un espacio sutil y claro. El RS aumenta en cisternas, pero presenta raras uniones con los túbulos T. En esta zona de los miotubos, aparece algún núcleo central, mitocondrias pequeñas en sus proximidades, multitud de ribosomas y ocasionalmente algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso. También localizamos aquí los gránulos limitados por membrana (0,06-0,30 μm), en relación con complejos de Golgi, compatibles con productos de secreción. En la zona ecuatorial se ha descrito en algunas especies de mamíferos un delgado anillo continuo y periférico de miofibrillas que rodean el empaquetamiento nuclear. En estas miofibrillas, los

miofilamentos, escasamente alineados, están distribuidos al azar, con bandas Z muy disminuidas y pérdida completa de línea M.

Se ha pretendido incluir en esta clasificación otra forma de fibras intermedias, pero en la actualidad se las considera como variaciones morfológicas de diferentes especies de mamíferos, con un patrón histoquímico común, igual al de las fibras con núcleos en cadena (Milburn, 1973). En el hombre se ha descrito una población celular diferente en las regiones polares del huso. Son células fusiformes, orientadas longitudinalmente, alojadas en un canal de la superficie de las fibras con núcleos en saco y menos veces en las fibras con núcleos en cadena. Están incluidas dentro de la lámina basal y a veces también aparecen en asociación con las fibras musculares extrafusales. Son probablemente de estirpe mioblástica (Kennedy, 1970).

En relación con la estructura del huso neuromuscular, debemos considerar dos tipos de innervación, que penetran en él, por el espacio periaxial (Adal, 1969). Una vía aferente, que lleva la información del estiramiento muscular a la médula. En este sentido, cada célula en saco nuclear recibe una rama terminal de una gran fibra mielínica sensitiva tipo IA, gruesa de 8-10 μm de diámetro, cuya terminación describe una espiral alrededor de la bolsa nuclear llamada terminación anuloespiral o terminación primaria.

Las células en cadena nuclear reciben la innervación aferente de dos fuentes. Unas ramas terminales que provienen de la misma fibra nerviosa mielínica anterior, aferente primaria, que ocupan rodeándolas las regiones centrales de estas células originando las terminaciones primarias, y en segundo lugar, las aferentes secundarias que son ramas de fibras independientes, de menor calibre (6-10 μm de diámetro), que acaban a cada lado de la terminación primaria, en forma de ramo, constituyendo las terminaciones secundarias (Barker y cols, 1970). La terminación primaria responde a la intensidad y rapidez del estiramiento muscular mientras que la secundaria reacciona solo al grado de estiramiento.

Hemos de considerar también la existencia de unas terminaciones eferentes sobre el huso neuromuscular, que tienen por objeto regular su umbral de excitabilidad, por medio de un mayor o menor grado de contracción de las fibras intrafusales (Emonet-Denand y cols, 1971; 1972). Estas fibras forman pequeñas placas motoras sobre las células del huso (Barker, 1948; Coers y Durand, 1956). Existen dos tipos de estas fibras motoras, que desde el Nobel Symposium de 1965 (Granit, 1966), se denominan β y γ . Las primeras son capaces de una contracción fásica y terminan exclusivamente sobre las fibras en saco nuclear. Las segundas son capaces de contracción tónica y acaban sobre los dos tipos de células. Ambos tipos de fibras nerviosas son delgadas con un diámetro de 3 a 7 μm (Schröder y cols, 1979 a y b) (Figura 21).

2.6.- TEJIDOS CONECTIVOS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

Estas estructuras de soporte conjuntivo, que se distribuyen alrededor del músculo o bien aparecen en sus extremos como tejido intermedio de anclaje, están constituidas por dos variedades de tejido conjuntivo, laxo y denso respectivamente. La primera corresponde a las vainas que rodean al músculo, con una distribución de fibras y una composición de la sustancia fundamental, que colaboran en el mantenimiento de las características mecánicas del músculo durante el movimiento. La segunda variedad que se encuentra en la zona de unión miotendinosa, es muy resistente y posee una estructura capaz de soportar una tensión considerable.

2.6.1.-Vainas musculares.

La disposición general del tejido conectivo alrededor de las células musculares, ya se ha mencionado anteriormente, refiriéndose a ellas como las estructuras laminares o vainas, que constituyen el epi, peri y endomisio (Figura 1). Estas vainas desempeñan un importante papel en la organización de los paquetes musculares, proporcionando coherencia mecánica, a la vez que permiten un cierto grado de movimiento dentro de él. Otra de sus misiones es proporcionar el camino por el que los nervios y los vasos se distribuyen en el interior del tejido.

El endomisio tiene una especial importancia al formar parte del microambiente de las células musculares, permitiendo el intercambio de metabolitos entre ellas y los capilares vecinos. Su matriz rica en mucopolisacáridos es también fundamental, para mantener el flujo de iones durante la excitación de la membrana de la fibra muscular (Hill, 1970).

La proporción y tipo de moléculas de colágeno varía de unas zonas a otras, y así, el epimisio y el perimisio contienen colágeno tipo I como componente principal y tipo III en menor proporción. El perimisio también contiene pequeñas cantidades de colágeno tipo V (Duance y cols, 1980). El endomisio presenta los tipos I y III como componentes principales, escasa proporción del tipo V y una moderada cantidad de colágeno tipo IV, propio de las membranas basales, como demostraron Light y Champion (1984).

2.6.2.-Unión miotendinosa.

La forma en que las fibras musculares transmiten su fuerza contráctil a las estructuras vecinas, depende de la interacción entre estas fibras y el tejido conectivo que las rodea. En este sentido, son importantes las zonas de unión entre los extremos de las células musculares y las inserciones tendinosas, llamadas uniones miotendinosas. En esta unión, el tejido conectivo de las tres vainas se hace muy fibroso y denso y sus prolongaciones constituyen los haces de fibras del tendón (Schippel y Reissig,

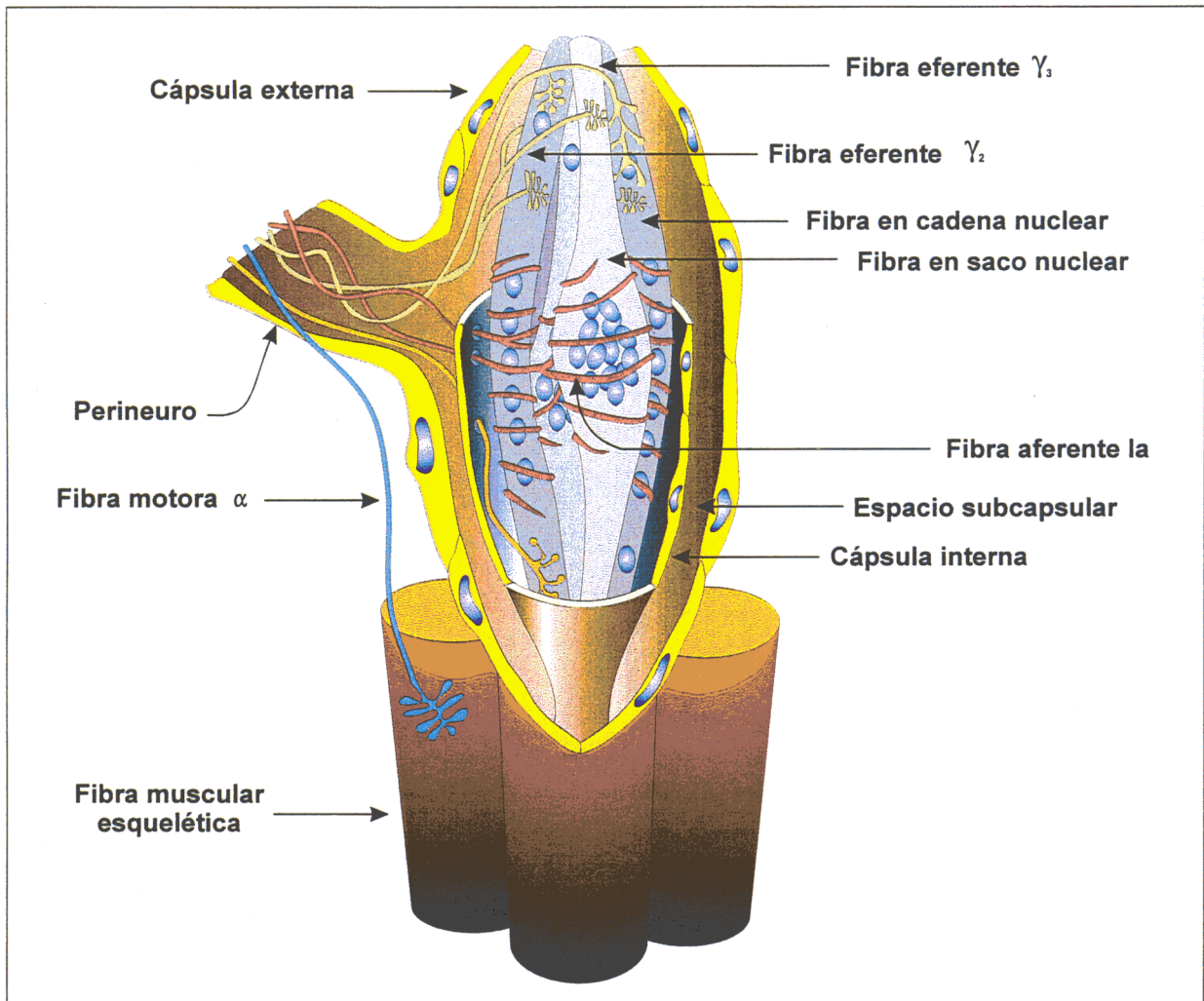


Figura 21.- Representación esquemática tridimensional de un huso neuromuscular. Modificado de Krstic, 1989.

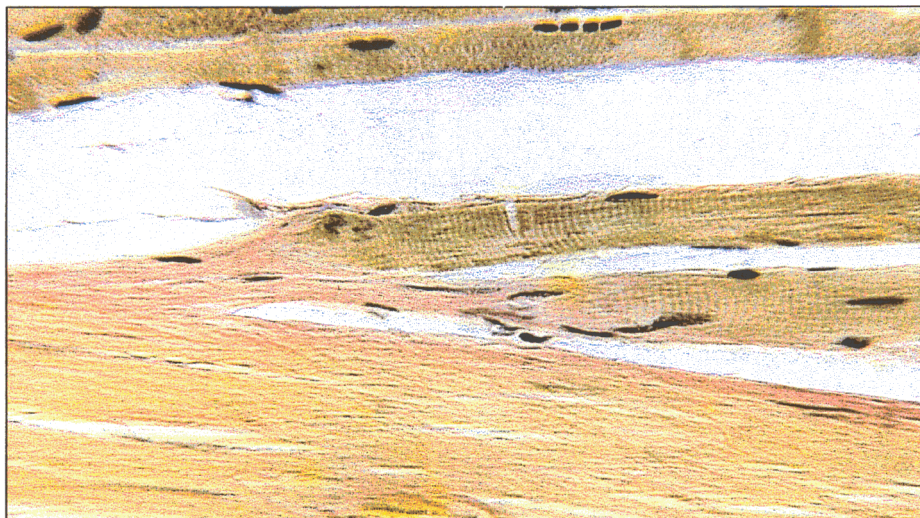


Figura 22.- Unión miotendinosa, apreciándose la cohesión existente entre las vainas de reticulina que recubre el sarcolema y las fibras de colágeno del tejido conjuntivo vecino a la fibra muscular. Tinción de Van Gieson. 400x.

1968). Las fibras musculares en este punto pueden presentar formas variadas, romas, afiladas, o con una dilatación terminal (Muir, 1961; Stickland, 1983) (Figura 22).

El microscopio electrónico descubre que estos extremos de las fibras musculares, poseen un sarcolema con gran cantidad de indentaciones y una zona de hialoplasma en la que se insertan los filamentos de actina de las sarcómeras adyacentes (Hanak y Böck, 1971). Por fuera la lámina basal es gruesa y las fibras de colágeno y reticulina del conjuntivo están en íntimo contacto con ella. No existen indicios de desmosomas y parece probable que tanto aquí como a lo largo de toda la fibra muscular, las fuerzas contráctiles se transmitan de la superficie celular a la matriz del tejido conectivo circundante, principalmente por cohesión viscosa con sus fibras y su sustancia fundamental (Gelber y cols, 1960; Ishikawa, 1965).

2.7.- EMBRIOLOGÍA.

Las células que participan en la organogénesis del tejido muscular esquelético estriado, pueden dividirse en tres compartimentos: 1) Células de origen somatopleural, que van a formar el tejido conjuntivo muscular y que se separan del mesénquima subcutáneo en las regiones destinadas a musculatura; 2) células de origen somatopleural, que se diferencian en blastema tendinoso en las regiones extremas del futuro músculo; y, 3) células de origen somítico, que van a originar la línea miogénica (Chevallier y cols., 1977; Plaghki, 1985). Esta última línea celular se origina de una población de células madre, que emigra desde la cresta dorsal de los somitos. El mesodermo somítico segmentado no presenta ninguna especificidad regional y son los factores microambientales, tales como la matriz de colágeno extracelular y sus fibronectinas asociadas, los que determinan la dirección de migración de las células musculares originales (Chevallier, 1978; Ordahl y Le Douarin, 1992).

El ciclo celular de la línea miogénica, se ha llegado a conocer utilizando cultivos de células progenitoras. De esta forma sabemos que la población de células madre, puede dar origen a mitosis asimétricas, ante determinados estímulos, de manera que cada una produce una célula mioblástica embrionaria y otra célula madre, que mantiene el depósito. Los mioblastos diferenciados emigran a su localización definitiva y aumentan su diámetro (Ontell y cols., 1988). En este momento son células de mayor tamaño, con núcleo eucromático grande y llamativos nucleolos. En su citoplasma hay abundante retículo endoplásmico rugoso y numerosos polirribosomas, propio de las células con intensa síntesis proteica (Hilfer y cols., 1973). Estas células se van alineando unas con otras, para posteriormente fusionar sus membranas y formar una célula alargada, tubular y multinucleada. La alineación se ve favorecida por un tipo de fibronectinas segregadas por ellas mismas (Chiquet y cols, 1981). La fusión se acompaña de una entrada de calcio, por modificaciones del 1'AMP-c de la membrana, mediante la acción

de la prostaglandina E1 (PGE1) sobre la superficie del mioblasto (David y Higginbotham, 1981)(Figura 23 y 24).

Estos mioblastos embrionarios, han sido estudiados también en cultivos celulares marcados con vectores retrovirales (Wigmore y Dunglison, 1997), y se ha llegado a saber que en este periodo de su existencia es una célula activa, capaz de producir miosina embrionaria y que actúan como señales de localización para la llegada y alojamiento de una nueva población de mioblastos, llamados mioblastos fetales. En cultivos prolongados de células embrionarias mioblásticas, nunca llegan a convertirse en células fetales, lo que refuerza la idea de que ambas poblaciones tienen precursores diferentes (George-Weinstein y cols., 1993).

Con esta base de miotubos formados y las señales de localización que emiten, se produce la llegada de una nueva oleada de mioblastos, que se han dado en llamar mioblastos fetales, por producirse en un periodo del desarrollo más avanzado y porque en un principio se creyó que eran la línea evolutiva de la vida fetal. Estos mioblastos se colocan sobre la superficie de los mioblastos embrionarios y la imagen que ofrece este conjunto evolutivo, es la de una célula alargada central y multinucleada, el miotubo embrionario, rodeado de una nueva generación de células mononucleadas pequeñas, que utilizan la membrana de las anteriores como andamio para su fijación y con una lámina basal común (Cifuentes-Díaz y cols., 1995). Posteriormente las células recién llegadas se fusionan entre sí, formando una estructura longitudinal paralela a la anterior, que conocemos como miotubos secundarios fetales. Son capaces de sintetizar un tipo de miosina diferente, de contracción lenta (MHCs). La fusión de estas células coincide en el tiempo, con la llegada a zonas vecinas, de placas motoras en formación (Duxson y cols., 1989)(Figuras 23 y 24).

Después de un periodo de tiempo, estas fibras nuevas formadas se separan de la superficie del miotubo primario y una nueva oleada de células con el mismo precursor que las fetales, se fijan sobre las primarias. Son células secundarias adultas, llamadas así por aparecer en último lugar, con síntesis de miosina de contracción rápida (MHCf) y con receptores de AcCo en su membrana, como características funcionales de diferenciación con las fetales (Yablonka-Reuveni, 1995). Alrededor de esta formación aparece también el halo de las secundarias fetales que se han separado, y que tienen posibilidad de corregir su orientación en el paquete muscular, mientras que la posición de los miotubos adultos, dependen definitivamente de la orientación de la célula embrionaria que actuar de guía (Wigmore y cols., 1995). Ambos tipos de fibras secundarias continúan su crecimiento y diferenciación y aumentan el número de núcleos por progresiva fusión celular, incluso en el periodo postnatal (Figuras 23 y 24).

Cada célula embrionaria primaria puede servir de fijación y guía a un número variable de células secundarias, desde 5 a 9 en los pequeños mamíferos (Ontell y cols.,

1988), hasta aproximadamente 20 en el hombre (Stickland y Handel, 1986). Cuando su actividad inductora cesa, disminuye su diámetro y se confunde con el resto de las fibras. Algunas células mononucleadas persisten adheridas a su superficie por debajo de su lámina basal y parecen estar en relación con la población de células satélites descritas por Mauro (1961).

En un principio se pensó que la expresión de distintos tipos de miosina en las células secundarias, que va a dar lugar a diferentes tipos de fibras musculares de contracción rápida o lenta, dependía de los primeros contactos axónicos, durante el desarrollo de la innervación (Marechal y cols., 1984), pero posteriormente se ha visto la presencia de dos poblaciones de miotubos, embrionarios y fetales, conteniendo dos tipos de miosina ya sea alcalo- o ácido-estable, en ausencia de innervación, lo que sugiere la posibilidad de que las células mioblásticas posean su identidad metabólica, antes de toda innervación (Fremont y cols., 1983; Schiaffino y Reggiani, 1996) (Figura 25).

Una vez innervados los primeros esbozos musculares tienen un tiempo de contracción siempre largo, por contener miosina lenta (Condon y cols., 1990), y es posteriormente cuando al aparecer los miotubos de segunda generación, se sintetiza una miosina de contracción rápida (Devoto y cols., 1996), exclusivamente alcalo-estable, que darán origen a las fibras musculares tipo II. En semanas sucesivas, parte de estas células, se transforman en fibras musculares tipo I por el cambio de sus motoneuronas de fásicas a tónicas, interpretándose este hecho como una adaptación por el uso del músculo (Rubinstein y Kelly, 1981).

Durante todo este proceso, fueron localizados RNAm para miosinas en regiones periféricas de las células primarias y secundarias, contribuyendo a que los polirribosomas de esta localización fabriquen las proteínas cerca de las membranas (Young y cols., 1975). Las miosinas II recién formadas, se asocian con otros filamentos del citoesqueleto de 4 a 10 nm de diámetro, que las orientan paralelas al eje longitudinal de las células (Pomeroy y cols., 1991), y por acción de la transglutaminasa estas moléculas de miosina se asocian entre ellas y forman filamentos (Kang y cols., 1995).

En la membrana aparecen moléculas de α v-integrina, más concentrada a nivel de la zona de nacimiento de las miofibrillas, contribuyendo a ordenar los filamentos de miosina y actuando como receptores de adhesión que más tarde formaran parte de los costámeros de las células maduras. Por lo tanto tienen un papel de anclaje lateral miofibrilar. Otra integrina, la α 3, también parece relacionada con estas primeras miofibrillas al comienzo de la miofibrinogénesis, pero se disocia de su localización al comenzar la estriación, lo que sugiere un posible papel estabilizador en las primeras etapas (McDonald y cols., 1995).

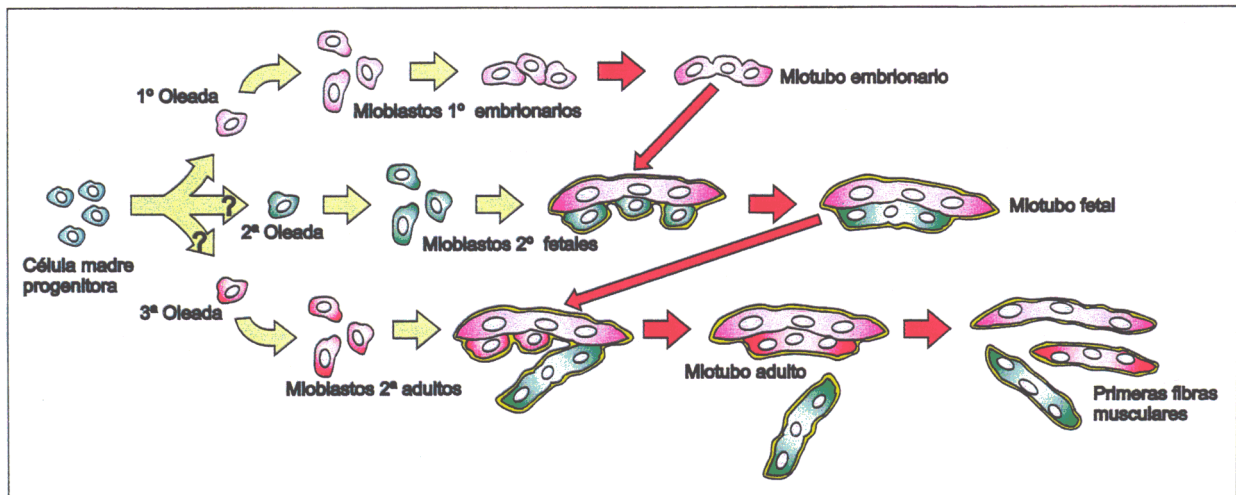


Figura 23.- Representación esquemática de la miogénesis y contribución de las diferentes poblaciones celulares.

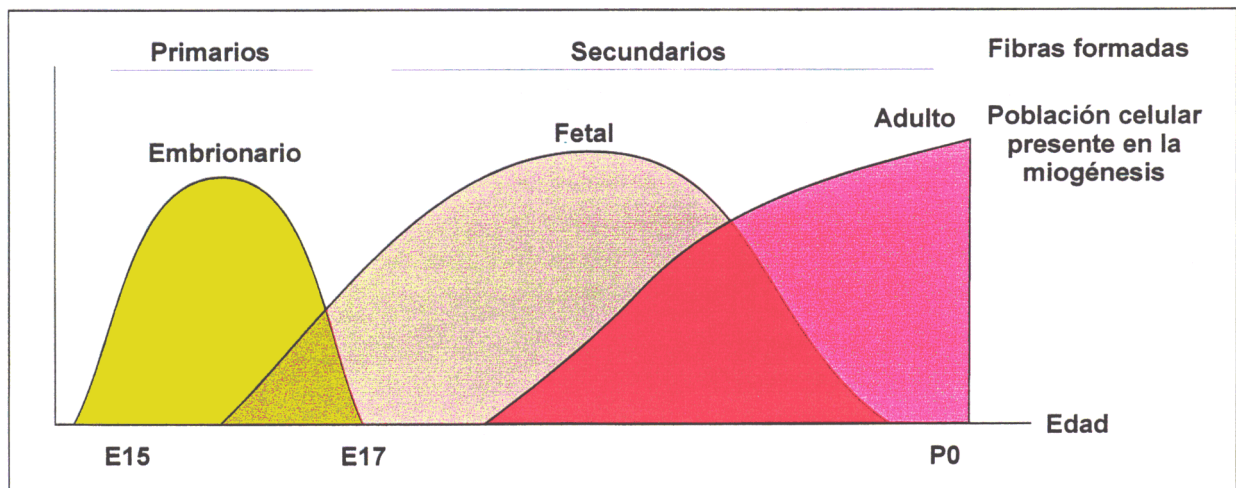


Figura 24.- Aparición de las diferentes poblaciones de células miogénicas durante la miogénesis prenatal de la rata. Modificado de Stockdale, 1992.

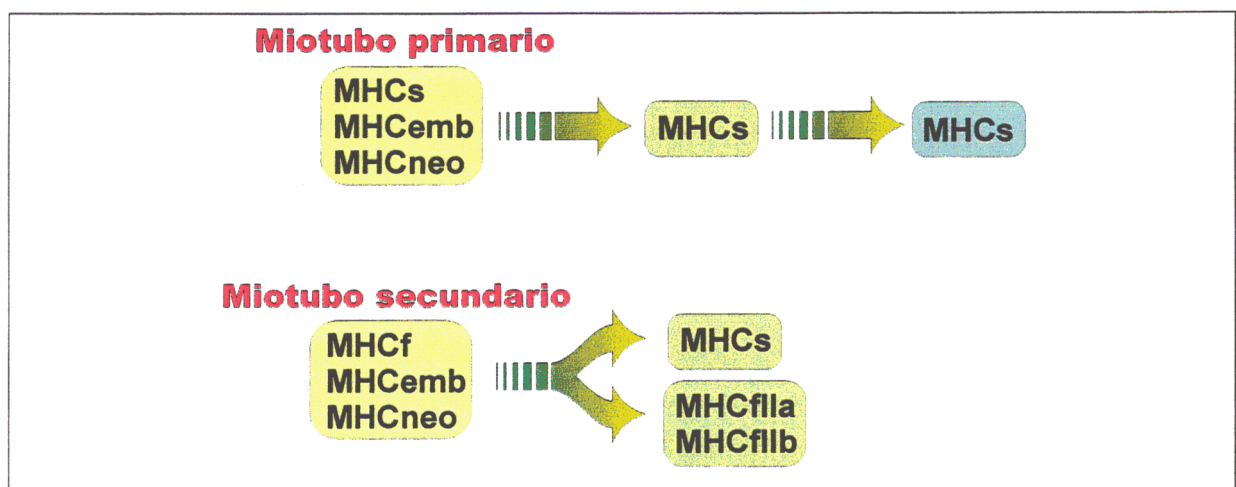


Figura 25.- Representación esquemática de la expresión de las diferentes isoformas de miosina, durante la miogénesis de las fibras extrafusales humanas.

Los filamentos polarizados de actina, se originan por adición de moléculas de actina G, nucleados desde las proximidades de moléculas de α -actinina, que a su vez se relacionan con otras proteínas de la futura línea Z, en la sarcómera inicialmente alineada, para ir formando la banda I. Su extremo "mas" tiene proteínas cap-Z, que sirven de unión con la α -actinina, para fijarse en el resto de proteínas que van a formar la línea Z (Schafer y cols., 1995). A la vez se va incrementando la alineación de filamentos gruesos en forma de agregados dispuestos en la zona que corresponde a la banda A pudiendo verse a veces un esbozo de la línea M (Briggs y cols., 1995).

Las moléculas de titina empiezan a detectarse en estadios tempranos inmediatamente después de la orientación longitudinal de la célula, mientras que las de nebulina solo se hacen patentes cuando se distinguen con claridad la línea Z y la estriación en las fibras secundarias (Behr y cols., 1994).

La formación del sistema de membranas requiere interacciones específicas membrana-membrana y membrana-citoesqueleto. El primer estadio coincide con la miofibrinogénesis temprana de los miotubos. La complejidad del sistema y su capacidad para liberar Ca^{2+} a través de la célula en desarrollo, es paralela a la formación de las miofibrillas (Takekura y cols., 1994). Al principio aparecen invaginaciones pequeñas de la membrana, que al ir progresando originan delgados túbulos T, en la periferia de las fibras, para avanzar posteriormente en todo su espesor. El RS empieza a ser abundante en el momento en que los túbulos T se invaginan hacia el interior y forma regularmente espacios cruzados con las estriaciones localizadas en las bandas I-Z-I. Hay tres situaciones claves en este proceso: a) interacción del RS con la línea Z, independiente del túbulo T, b) interacción del RS con el túbulo T para formar las triadas, independiente de las miofibrillas, y c) asociación de las triadas con las miofibrillas, en el límite de A-I (Flucher y cols., 1993). Durante todo el desarrollo de membranas se van detectando en ellas concentraciones crecientes de proteínas fijadoras, transportadoras y liberadoras de Ca^{2+} , que van a regular el acoplamiento excitación-contracción, desde los primeros estadios, tanto en fibras primarias como secundarias (Takekura y cols., 1994).

El crecimiento postnatal implica modificaciones de hipertrofia e hiperplasia de la fibra muscular, con características específicas dada su naturaleza sincitial. El crecimiento hipertrófico se produce por división de las células satélite, de manera asimétrica, y su fusión posterior a la célula muscular (Moss y Leblond, 1971). La longitud óptima (aquella con la que el músculo es capaz de producir la tensión isométrica máxima), se consigue por adición de sarcómeras en serie, principalmente en los extremos de la célula (Williams y Goldspink, 1978), que varían en número rápidamente dependiendo de la inmovilización o el ejercicio (Oudet y Petrovic, 1981; Tardieu y cols, 1981). El crecimiento hiperplásico se realiza por un aumento del número de células. Este es un hecho puesto en duda largo tiempo, insistiendo la mayoría de los autores en una estabilidad e incluso disminución en el número de fibras musculares en la vida

postnatal. Dicho número viene determinado genéticamente para cada especie animal y cada músculo, dependiendo tanto del peso corporal, como del propio músculo y la función que deba realizar (Layman y cols, 1980).

3.- HETEROGENEIDAD DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS EXTRAFUSALES

3.1.- RECUERDO HISTÓRICO.

Debemos a Stefano Lorenzini (1678) la primera clasificación de fibras musculares, basándose en el color (Ciaccio, 1898), confirmada dos siglos más tarde por Ranvier (1873; 1874 a y b; 1880) que sugiere diferencias fisiológicas entre las fibras rojas y blancas, relacionando el color con la contracción rápida y lenta respectivamente. Así mismo observa una mayor afluencia de riego sanguíneo en el músculo rojo que en el blanco. Previamente, en 1857, Kölliker había descrito unos gránulos que se encuentran en el sarcoplasma de las fibras oscuras, aventurando la hipótesis de que tuvieran relación con el metabolismo propio de las fibras. Siguiendo en la misma línea, Grützner (1884) señala en los músculos de los vertebrados, la existencia de unas fibras delgadas y oscuras y otras más gruesas y de color claro, haciendo responsable de esta variación a dichos gránulos sarcoplásmicos. Retzius (1890) sugiere que estos gránulos corresponden a los sarcosomas, pero Knoll (1891), determinó su naturaleza lipídica y sostiene que la diferencia de color de las fibras viene dada por la diferente cantidad de protoplasma entre las miofibrillas, dividiéndolas en dos grandes grupos: unas ricas en protoplasma (protoplasma reiche) y otras pobres en protoplasma (protoplasma arme). También observa que hay músculos constituidos exclusivamente por fibras oscuras o rojos, otros por fibras claras o blancos y otros mixtos, que poseen ambas clases de fibras.

Lee y cols. (1916), estudiando en el gato los músculos extensor digitorum longus (EDL), gastronemius, soleus y diafragma, encontraron diferencias bioquímicas y fisiológicas entre ellos, pero no fueron capaces de demostrar una correlación entre esas variaciones y las características histológicas. Bullard (1919) confirma estos datos, al ser capaz de demostrar mediante la tinción con Sudán III, que los músculos están constituidos por fibras claras, oscuras e intermedias y que había una variación en la proporción y tamaño de las fibras que componían estos músculos. Denny-Brown (1929), con este mismo modelo experimental, observó también que las fibras oscuras tienen un alto contenido en lípidos, muy superior al contenido en las fibras claras, pero tampoco fue capaz de demostrar la correlación entre los hallazgos histológicos de las fibras y su velocidad de contracción.

Bensley y Hoerr (1934), introduciendo en sus estudios métodos de centrifugación diferencial, localizan ciertas enzimas en diferentes fracciones de fibras musculares,

como en las mitocondrias y los sarcosomas. Paul y Sperling (1952), relacionaron la densidad de mitocondrias y los procesos de actividad respiratoria, con los diferentes tipos de fibras, demostrando que el músculo blanco tiene un bajo contenido en ellas y por tanto, posee una baja actividad respiratoria, mientras que en el músculo rojo ocurría lo contrario, es decir, poseía una alta actividad respiratoria por la gran cantidad de mitocondrias. (Tabla I).

Tipos de fibras musculares		Autores
Rojas	Blancas	Lorenzini 1678 Ciaccio 1898
Contracción rápida Riego sanguíneo ++	Contracción lenta Riego sanguíneo +	Ranvier 1874
Gránulos sarcoplásmicos		Kölliker 1857
Delgadas y oscuras	Gruesas y pálidas	Grützner 1884
Gránulos sarcoplásmicos lipídicos +++ Ricas en protoplasma	Lípidos + Pobres en protoplasma	Knoll 1891
Mitocondrias +++ Actividad respiratoria +++	Mitocondrias + Actividad respiratoria +	Paul y Sperling 1952

Tabla I.- Primeros intentos de clasificación de las fibras musculares, basados en hallazgos morfológicos.

3.2.- DIFERENCIACIÓN HISTOQUÍMICA.

Con la llegada de las técnicas histoquímicas, que hacen posible localizar sistemas enzimáticos y otros constituyentes químicos a nivel celular, se abre un nuevo campo de experimentación, en el estudio de los distintos tipos de fibras que componen el músculo. Por las características metabólicas de este tejido, las enzimas que más interesaron en su estudio fueron las implicadas en la síntesis y degradación del glucógeno, oxidoreductasas e hidrolasas.

Basándose en el clásico método del azul de metileno para demostración de succino-deshidrogenasa (SDH), con modificaciones que mejoran su sensibilidad, varios autores comprueban su variación individualizada en las fibras musculares, y así, Semenoff (1935) presenta sus investigaciones en músculos de anfibios; Ligman y Rutemburg (1951) en los músculos de rata; Wachstein y Meisel (1955) hablan de una mayor proporción de fibras SDH⁺ en el diafragma y la reacción más intensa en corazón y lengua de rata y conejo; Buño y Germino (1958) llegan a los mismos resultados en la rata; Nachmias y Padykula (1958) demuestran que en el sóleo de la rata la reacción es uniforme e intensa en las fibras que lo componen, que son rojas, mientras que en el

bíceps femoris o tibialis anterior, que es un músculo mixto, había una marcada variación de actividad enzimática, con tinción más intensa en las fibras de menor diámetro, que a su vez contenían más mitocondrias por unidad de área. Paralelamente, George y Scaria (1958), siguiendo técnicas similares, consiguieron una alta correlación entre la actividad enzimática oxidativa en el músculo rojo y su alto contenido en mitocondrias. Wachstein y Meisel (1955), fueron los primeros en aplicar estos métodos al músculo humano, en material de autopsias y demostraron, igual que en otros mamíferos, la reacción más intensa a la SDH en las fibras de pequeño diámetro (Fazarinc y cols., 1995).

Los trabajos de Ogata (1958a, b, c) fueron especialmente clarificadores al utilizar métodos enzimáticos adicionales en músculos de peces, anfibios, aves y mamíferos. Con el método de la SDH reconoció tres tipos de fibras: a) Fibras blancas y gruesas con débil actividad enzimática; b) Fibras finas y rojas con gran actividad enzimática; y, c) Fibras intermedias en cuanto a tamaño y actividad enzimática. La proporción de las tres clases de fibras variaba según el músculo estudiado. Este mismo autor, utilizando métodos de citocromo-oxidasa, difosfopiridín-nucleótido-diaforasa (DPN) y trifosfopiridín-nucleótido-diaforasa (TPN), encontró variaciones similares, pero ni él, ni Beckett y Bourne (1958) en un estudio similar, consiguieron demostrar alguna correlación entre la actividad de la SDH y la citocromo-oxidasa. (Tabla II).

Características	Tipos de fibras musculares			Autores
	Rojas	Intermedias	Blancas	
Mit/superf.	+++	++	+	George y Scaria 1958
Diámetro fibra	Delgada	Mediana	Gruesas	Nachmias y Padykula 1958 Ogata 1958
Actividad Enz.:				Semenoff 1935
SDH	++++	++	+	Wachstein y Meisel 1955
Citocromo oxidasa	++	+	+	Nachmias y Padykula 1958
DPN-TPN	++++	++	+	Buño y Scaria 1958 Ogata 1958

Tabla II.- Primera clasificación de las fibras musculares basada en la correlación de imágenes morfológicas y hallazgos histoquímicos.

A partir de este momento empiezan a aparecer numerosas clasificaciones, según los hallazgos de diferentes grupos de investigadores. Dubowitz y Pearse (1960a y b) mediante el estudio de la actividad fosforilasa y varios enzimas oxidativos, proponen una clasificación en dos grandes grupos, tanto en animales de experimentación como en el hombre. Unas fibras llamadas tipo I, con alta actividad oxidativa y débil actividad glicolítica, y otras fibras denominadas tipo II, con baja actividad oxidativa y alto grado

de actividad glicolítica. También fueron observadas fibras intermedias, pero no las dieron entidad propia. (Tabla III).

Características enzimáticas	Tipos de fibras	
	Tipo I	Tipo II
Actividad oxidativa	Alta	Baja
Actividad glicolítica	Baja	Alta

Tabla III.- Clasificación de los tipos de fibras musculares según Dubowitz y Pearse (1960).

Engel (1962), continuando con la línea iniciada por Wachstein y Meisel (1955), en material de autopsias y biopsias humanas, encontró también dos tipos de fibras, pero tomaba como base la diferente actividad ATPásica miofibrilar, hablando de tipo 1, con baja actividad ATPásica y tipo 2, con alta actividad, correspondiendo solo en parte a los tipos de fibras puestos de manifiesto mediante enzimas oxidativos. (Tabla IV).

Características enzimáticas	Tipos de fibras		
	Tipo 1	Tipo 2	
	Baja	Alta	
Actividad ATPásica		pH 4,6 Tipo 2B y 2C	pH 4,3 Tipo 2C
			pH 9,4 Tipo 2A, 2B y 2C

Tabla IV.- Clasificación de los tipos de fibras basada en su actividad ATPásica, Engel (1962); Brooke y Kaiser (1973).

Stein y Padykula en ese mismo año (1962), y en contraposición con los autores anteriores, sugirieron un sistema más complejo, reconociendo tres tipos de fibras que denominaron A, B y C, basándose en el tamaño y distribución de mitocondrias y en la reacción de la SDH. Dichos autores, además de la técnica antes mencionada pusieron en juego también la reacción ATPásica, esterásica y glicogénica de las fibras, para la mejor identificación y agrupación de los tres tipos antes mencionados (Tabla V).

En un intento de correlación entre las reacciones histoquímicas y las propiedades fisiológicas de velocidad de contracción de las diferentes fibras musculares, Guth y Samaha (1969), evaluaron bioquímicamente las propiedades de la miosín ATPasa, y parecieron estar de acuerdo con la reacción histoquímica para la ATPasa, proponiendo la siguiente denominación: a) "Rápida-contracción blancas", caracterizadas por su marcada actividad ATPásica y negativa para la nicotín-adenín-dinucleótido tetrazolium reductasa (NADH-TR); b) "Rápida contracción roja" con marcada actividad ATPásica y NADH-TR y, por último, c) "Lenta-contracción intermedias", que poseían una baja

actividad ATPásica e intermedia actividad NADH-TR. Barnard y cols. (1971) argumentaron que la velocidad de contracción guardaba una relación más estrecha con la actividad ATPásica que con la NADH-TR. Las fibras que poseían una alta reactividad ATPasa eran de contracción más rápida, mientras que las de reacción más débil eran a su vez más lentas en su contracción.

Tipos de fibras	Características
A o blancas	SDH: red escasa y lineal de pequeñas partículas ATPasa +
B o intermedias	SDH: Red más abundante y uniforme ATPasa -
C o rojas	SDH: Red muy abundante de partículas muy grandes concentradas en las zonas subsarcolémica ATPasa +

Tabla V.- Clasificación de los tipos de fibras musculares según Stein y Padykula (1962).

En la década de los setenta, Brooke y Kaiser (1970) usando la técnica de la ATPasa y preincubando, con variación del pH, demostraron la existencia de varios subtipos de fibras dentro de las de tipo 2 de Engel (1962). Preincubando a pH 4,6, desaparecía la actividad ATPásica de unas fibras que denominaron 2A. Variando el pH a 4,3 desaparecía la actividad de otras fibras, además de las anteriores y las denominaron 2B y por último quedaban dentro del tipo 2, unas fibras que no se inhibían con ninguno de los pH anteriores, denominándolas 2C. Un año después, Brooke y cols. (1971) observaron que en los animales jóvenes la primera diferenciación de las fibras musculares se realiza en las fibras tipo 1 y tipo 2C, mientras que en los animales adultos, el tipo 2C se diferencia sucesivamente en 2B y 2A. Posteriormente (1973) Brooke y Kaiser vuelven a plantearse si las fibras 2C son un subtipo individualizado o son sólo precursoras de otros tipos de fibras. (Tabla IV).

Recopilando todos los datos anteriores, Peter y cols., (1972) proponen una nueva clasificación para los tres tipos de fibras clásicos: oxidativa lenta (SO), glicolítica rápida (FG) y glicolítica oxidativa lenta (FOG). (Tabla VI). Dubowitz y Brooke (1973), trataron de hallar una correlación significativa en todos estos parámetros y propusieron una clasificación amplia como base para posteriores estudios. (Tabla VII).

Posteriormente, numerosos autores han llevado a cabo estudios sobre la estimación de la actividad enzimática en fibras microdisecadas (Spamer y Pette, 1977; 1979; Lowry y cols, 1978; Hintz y cols, 1980; Nemeth y cols, 1981), o por medición microfotométrica de la reacción enzimática en cortes transversos seriados (Spurway, 1981; Nemeth y Pette, 1981; Reichmann y Pette, 1982), que demuestran una correlación entre el análisis bioquímico y las características histoquímicas de los

distintos tipos de fibras. Pero después de todo lo anteriormente expuesto y tomando como base la clasificación de Dubowitz y Pearse (1960 a y b), y las posteriores

Tipos histoquímicos de fibras					Autores
	1	2A	2B	2C	
Nomenclatura fisiológicas	Contracción lenta Intermedias	Contracción rápida roja	Contracción rápida Blanca		Barnard y cols. 1971
	SO Contracción lenta Oxidativa	FOG Contracción rápida Oxidativa, glicolítica	FG Contracción rápida Glicolítica		Peter y cols. 1972
	S Contracción lenta	FR Contracción rápida Resistente a la fatiga	FF Contracción rápida Sensible a la fatiga		Burke y cols. 1971, 1973

Tabla VI.- Correlación entre la nomenclatura fisiológica y las características histoquímicas de los diferentes tipos de fibras musculares.

Apariencia anatómica	Roja o blanca Oscura o clara Alta o baja granulosidad Rica o pobre en protoplasma Diferencias subcelulares al microscopio electrónico
Funcionamiento fisiológico	Contracción lenta o rápida Alta o baja resistencia a la fatiga
Propiedades bioquímicas	Alta o baja actividad respiratoria Alto o bajo contenido en constituyentes químicos enzimáticos
Características histoquímicas	Alto o bajo contenido en enzimas Enzimas situados en las inmediaciones o en las fibras

Tabla VII.- Cuadro de correlación entre diferentes parámetros propuesto por Dubowitz y Brooke (1973).

subdivisiones de Brooke y Kaiser (1970), en la actualidad se acepta la siguiente nomenclatura para los distintos tipos de fibras: primeramente dos grandes grupos denominados fibras tipo I y tipo II, y dentro de este segundo grupo existe una segunda subdivisión que correspondería a las fibras tipo IIa, IIb y IIc. Aunque trabajos de Ingjer (1979 a y b), Staron y cols (1983) y posteriormente Biral y cols (1988), describen dos subgrupos más, tipo IIab y IIac, dentro del grupo de fibras tipo II, ellos mismos en sus conclusiones, apuntan la teoría de la posible existencia de un equilibrio dinámico entre las fibras tipo IIa y IIb y estos dos nuevos grupos, corresponderían a estados de transición entre uno y otro tipo. (Tabla VIII).

Reacción	Tipos de fibras musculares			
	1	2A	2B	2C
ATPasa de rutina(pH 9,4)	+	+++	+++	+++
ATPasa preincubada a pH 4,6	+++	0	+++	+++
ATPasa preincubada a pH 4,3	+++	0	0	++
NADH-TR	+++	++	+	++
SDH	+++	++	+	++
Menadiona α -glicerofosfato	0	++	++	+
PAS	+ o ++	+++	++	++
Fosforilasa	0 o +	+++	+++	+++

Tabla VIII.- Clasificación enzimática actual de los distintos tipos de fibras musculares

3.3.- ESTUDIOS INMUNOCITOQUÍMICOS.

Tanto los filamentos finos y gruesos, como los discos Z y las proteínas asociadas, forman un complejo grupo de componentes proteicos, la mayoría de los cuales existen en múltiples isoformas (Schiaffino y Reggiani, 1996), por lo que la estructura y composición bioquímica de las sarcómeras, tiene un alto grado de variabilidad. Las proteínas de los miofilamentos y su concentración en este tejido específico, está regulado por genes isomórficos, en relación con la diferenciación de los tipos de fibras musculares. Cada familia de isoformas, refleja la existencia de la correspondiente familia multigénica, que muestran secuencias altamente homólogas y similar estructura exón-intrón y presumiblemente derivan de un mismo gen ancestral común. Las variantes analizadas presentan pues, el mismo origen genético, similar estructura proteica y similar papel funcional en el proceso contráctil (Wang y Rubenstein, 1992). Estas isoformas aparecen normalmente durante el desarrollo o pueden ser inducidas por influencias neuronales y hormonales (Bandman, 1992). La intercambiabilidad de las isoformas de miofibrillas, está claramente demostrada en experimentos de extracción proteica, en fibras musculares aisladas (Moss, 1992).

En relación con el filamento grueso (tabla IX), dentro de la clase de miosinas II, se encuentran dos grandes grupos de isoformas, una para el músculo liso y las células no musculares, diferentes de las miosinas I, y otra para el músculo estriado y cardíaco (Pette y Staron, 1990). Entre las familias de multigenes que regulan la expresión de las isoformas esqueléticas, se encuentran los genes MHC y los genes MLC ambos reguladores y esenciales (Robbins y cols., 1986). Los genes MHC originan nueve RNAm diferentes, que se van a traducir en nueve isoformas de cadenas pesadas (Moore y

cols., 1992). Teniendo en cuenta que en las cadena ligeras se han podido caracterizar también seis isoformas básicas diferentes, se han clasificado en la actualidad según la propuesta de Schiaffino y Reggiani (1996).

La molécula de titina, muestra propiedades diferentes en diferentes músculos, especies y etapas del desarrollo, por lo que parece que existen múltiples isoformas, que todavía no están caracterizadas (Fürst y cols., 1988). En cuanto al resto de proteínas asociadas a este filamento, se sospecha que la proteína X puede ser una isoforma de la proteína C, igual que ocurre entre la proteína M y la miomesina, pero la existencia de estas isoformas, no está bien establecida (Bennett y cols., 1986).

En los filamentos finos (Tabla X), existen seis isoformas de actina (Vandekerckhove y cols., 1986), dos para músculo liso, dos para citoesqueleto y dos para músculo estriado, la α -actina esquelética y la α -actina cardíaca, todas ellas codificadas por diferentes genes. La secuencia de aminoácidos de las formas estriadas, es casi idéntica y su estructura es constante en todos los mamíferos (Vandekerckhove y Weber, 1997). La expresión varía dependiendo de la especie y el momento del desarrollo. En el hombre parece que hay una coexpresión de las dos isoformas tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco (Blanchard y cols., 1989).

La tropomiosina presenta dos isoformas, α -tropomiosina y β -tropomiosina, que a su vez pueden combinarse entre ellas para formar dímeros $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ y $\alpha\beta$ (Cummins y Perry, 1974). En los músculos estriados de los mamíferos, aparecen tres combinaciones, TM- β , durante el desarrollo, TM- α f en el músculo cardíaco y esquelético y TM- α s en el esquelético solo (Salviati y cols., 1983).

Para codificar las diferentes isoformas de troponina, hay varios genes implicados, cada uno de los cuales genera un gran número de transcritos utilizando diferentes exones (Greaser y Gergely, 1973). Los genes TnC-f y TnC-s originan una superfamilia de proteínas entre las que encontramos la calmodulina, parvalbúmina, TnC-f (4 uniones para Ca^{2+}) y TnC-s (1 unión para Ca^{2+}) (Nakayama y Kretsinger, 1994). Para la TnT existen hasta 64 isoformas originadas por tres genes, TnT-f, TnT-s y TnT-c (Abe y cols., 1986). También hay tres genes que codifican para TnI-f, TnI-s y TnI-c y las isoformas generadas solo varían ligeramente en la región NH_2 -terminal (Grabarek y cols., 1992).

Con respecto al resto de proteínas asociadas a este filamento, sabemos que la nebulina en el hombre está codificada por múltiples genes, que originan una gran variedad de isoformas, pero no están totalmente definidas (Labeit y Kolmerer, 1995). La expresión de isoformas de α -actinina está codificada por cuatro familias de genes, para músculo estriado, cardíaco, liso y células no musculares (Blanchard y cols., 1989). No hay constancia de isoformas de tropomodulina (Fowler y cols., 1993).

ISOFORMA	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
MHC- β s	Músculo esquelético adulto y ventrículo.	Lompré y cols (1984)
MCH-2A	Músculo esquelético adulto.	Pierobon-Bormioli (1981)
MHC-2X	Músculo esquelético adulto.	Smerdu y cols (1994)
MHC-2B	Músculo esquelético adulto.	Danieli-Betto y cols (1986)
MHC-emb	Músculo esquelético en desarrollo.	Whalen y cols (1981)
MHC-neo	Músculo esquelético en desarrollo.	
MHC- α	Maseteros y aurículas.	Butler-Browne y cols (1988)
MHC-ea	Músculos extraoculares y laríngeos.	Sartore y cols (1987)
MHC-m	Músculos masticatorios en carnívoros	Butler-Browne y cols (1982)
MLC-1f	Músculo esquelético adulto.	Nabeshima y cols (1984)
MLC-3f	Músculo esquelético adulto.	Periasamy y cols (1984)
MLC-1s/v	Músculo esquelético adulto y ventrículo.	Hallstone y Gunning (1990)
MLC-1s/a	Músculo esquelético embrionario y aurícula. Músculo esquelético adulto. Músculo liso y células no musculares.	
MLC-1emb/a	Músculo esquelético en desarrollo y aurícula	Robert y cols (1984)
MLC-2f	Músculo esquelético adulto en mamíferos.	Hoh y cols (1978)
MLC-2s	Transitorio en embrión humano.	
MBP-C-fast	Músculo esquelético rápido	Bennet y cols (1986)
MBP-C-slow	Músculo esquelético lento	
MBP-H	Músculo esquelético	
Proteína M	Músculo esquelético y cardíaco	
Miomesina	Músculo esquelético y cardíaco	
Titina (múlt. Isof.)	Músculo esquelético y cardíaco	Fürst y cols (1988)

Tabla IX.- Isoformas de proteínas miofibrilares que constituyen el filamento grueso, y su patrón de expresión en el músculo estriado de mamíferos.

Como estamos viendo, las isoformas de proteínas miofibrilares, muestran una distribución específica en cada tejido, e incluso pueden utilizarse como marcadores específicos para diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas. Esta distribución de las isomiosinas se ha estudiado exhaustivamente en el músculo, utilizando anticuerpos monoclonales (MoAb) y policlonales (PoAb). Los PoAb aplicados al músculo humano,

han demostrado la existencia de tipos de fibras comparables con los hallados histoquímicamente (Billeter y cols, 1980). Thornell y cols., (1984) mostró que los PoAb-miosina pueden revelar diferencias entre fibras que fueron histoquímicamente bastante uniformes, hecho que ya habían comprobado Gauthier y Lowey (1979), demostrando heterogeneidad para PoAb en fibras homogéneas en músculos de diferentes animales.

ISOFORMAS	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
Actina- α cardíaca	Músculo esquelético Músculo cardíaco	Blanchard y cols. (1989)
Actina- α esquelética	Músculo esquelético Músculo cardíaco	
TnC-f	Músculo esquelético rápido	Nakayama y Kretsinger (1994)
TnC-s/c	Músculo esquelético lento Músculo cardíaco	
TnT-1f TnT-2f TnT-3f TnT-4f TnT-fetales	Músculo esquelético lento Músculo en desarrollo	Abe y cols. (1986)
TnT-1s TnT-2s	Músculo esquelético lento	
TnT-1c TnT-2c TnT-3c TnT-4c	Músculo en desarrollo Músculo cardíaco	
TnI-f	Músculo esquelético lento Músculo cardíaco en desarrollo	
TM- α f	Músculo esquelético rápido Músculo cardíaco	Salviati y cols. (1983)
TM- α s	Músculo esquelético lento	
TM- β	Músculo esquelético Músculo cardíaco	
α -actinina-s/c	Músculo esquelético lento Fibras 2A rápidas Músculo cardíaco	Blanchard y cols.(1989)
α -actinina-f	Músculo esquelético rápido	

Tabla X.- Isoformas de proteínas miofibrilares que constituyen el filamento fino, y su patrón de expresión en el músculo estriado de mamíferos.

Pierobon-Bormioli (1981), fue capaz de caracterizar selectivamente las fibras musculares rápidas-blancas (tipo IIb) y rápidas-rojas (tipo IIa), en músculo de rata, usando unos anticuerpos específicos para músculo rápido-blanco y rápido-rojo, a partir de suero de cobaya incubado en conejo. Las fibras tipo I fueron identificadas con MoAb para miosina de músculo soleus. En sus conclusiones proponen la existencia de dos grupos de fibras con doble reactividad.

En la actualidad, los métodos histoquímicos se siguen utilizando paralelamente a los inmunohistoquímicos, como podemos ver en los trabajos de Santana-Pereira y cols, (1995) que han demostrado que la especificidad de la ATPasa miofibrilar y los MoAb anti MHC humana, (MHCI, IIA, IIB y IIA+IIB), es superponible y que en aquellas fibras con reacción ATPasa intermedia, aparece una coexpresión para diferentes isoformas de MHC, en cantidades variables dentro de cada una. En la misma línea, Staron (1997) intenta hacer un estudio sobre la distribución de los tipos de fibras en los músculos del cuerpo humano, a lo largo de su desarrollo.

Sin embargo, debemos recalcar que una misma isoforma puede expresarse en músculos diferentes, e incluso en células no musculares. En la tabla IX vemos como algunas formas cardíacas, pueden ser expresadas en algún estadio evolutivo en el músculo esquelético embrionario, y viceversa (Starr y cols. 1985; Kelly y cols. 1995). También hemos mencionado que un mismo músculo, dependiendo del tipo de fibras que lo integran, expresará una proporción diferente de isoformas y que incluso en una sola célula pueden coexistir varias isoformas, que de alguna forma van a influir sobre su capacidad funcional (Santana-Pereira y cols. 1995).

3.4.- VARIACIONES MORFOLÓGICAS EN LOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRAS.

Varios protocolos experimentales se encaminaron a correlacionar los hallazgos ultraestructurales con la histoquímica y fisiología de los distintos tipos de fibras, en el hombre y otros vertebrados. El uso de técnicas estereológicas cuantitativas (Eisenberg y Kuda, 1974; 1975 y 1976), los cortes ultrafinos (Sjöström y Squire, 1977a y b) y el estudio con microscopía electrónica de barrido (Ogata y Yamasaki, 1985), han aportado datos morfológicos absolutamente fiables, que concuerdan con los datos histoquímicos.

3.4.1.- Variaciones en la superficie de corte de la fibra.

Los primeros estudios se centraron en el diámetro de los distintos tipos de fibras, con resultados muy contradictorios, dependiendo de si el estudio se realizaba en hombre o en mujer (Brooke y Engel, 1969). Jennekens y cols. (1971), establecieron que las fibras tipo I tienen un diámetro bastante constante, mientras que las tipo II pueden variar dependiendo del músculo estudiado y del esfuerzo muscular realizado. En la actualidad

este dato no se utiliza para clasificar las fibras, pero sí para valorar la calidad de un entrenamiento o para medir el grado de recuperación tras una lesión neuromuscular.

3.4.2.- Variaciones en las mitocondrias.

Los primeros datos sistematizados en el estudio de este apartado, los encontramos en los trabajos de Shafiq y cols (1966), que muestran diferencias morfológicas concretas entre los distintos tipos de fibras: En el tipo I, las mitocondrias eran mayores tanto en número como en tamaño y en la complejidad de sus crestas. Aparecen como una ancha banda en la zona subsarcolémica y en agregados perinucleares. Otra localización constante es en las zonas intermiofibrilares, en forma de columnas paralelas a las miofibrillas. En el tipo II, son mucho menos abundantes, no existen las columnas interfibrilares, encontrando algunos elementos aislados. No hay agregados subsarcolémicos, excepto en las regiones perinucleares. Estos datos fueron confirmados más tarde por numerosos autores, en varias especies animales y en el hombre (Ogata y Murata, 1969a y b; Gauthier, 1969; 1970; Schiaffino y cols, 1970).

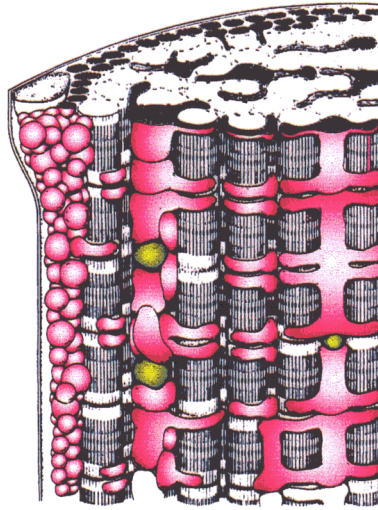
Ogata y Yamasaki (1985), muestran una definición exacta de la imagen que aporta la organización mitocondrial en las distintas fibras musculares (Figura 26). Distinguen dos poblaciones mitocondriales: a) Las Subsarcolémicas, de morfología redondeada, de gran tamaño, que aparecen en acúmulos densos bajo la membrana, siendo más numerosas en la zona perinuclear. Algunas de estas mitocondrias que están en contacto con la banda I de la miofibrillas, emiten una prolongación a este nivel. Su tamaño y número va disminuyendo de las fibras rojas a las intermedias y a las blancas. b) Las mitocondrias columnares intermiofibrilares, que vistas con microscopio electrónico de barrido, emiten ramas o prolongaciones bilaterales, que rodean las miofibrillas a ambos lados de algunas líneas Z, y se denominan mitocondrias-limitantes-bandas I, para diferenciarlas de otras redondeadas y sin prolongaciones que se localizan entre las miofibrillas a nivel de la banda I. Su presencia depende también del tipo de fibra, disminuyendo desde las tipo I a las tipo II, donde están prácticamente ausentes.

3.4.3.- Variaciones en las miofibrillas.

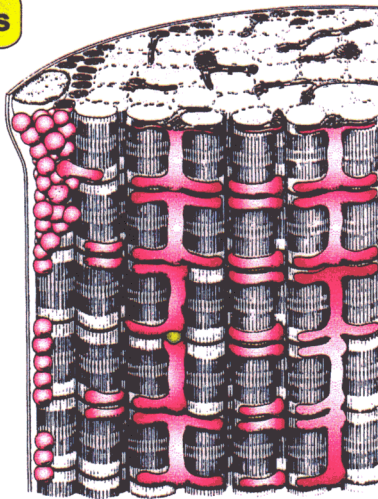
Las primeras aportaciones solo hablaban de una clara definición morfológica de la miofibrillas en las fibras tipo I, separadas por abundante citoplasma y de la separación irregular entre las miofibrillas de las células tipo II (Dietert, 1965).

Garamvölgyi (1972), en un amplio protocolo con varias especies de mamíferos, determinó que el tamaño de la línea Z, era el criterio morfológico más fiable para clasificar las fibras musculares, pero posteriormente Sjöström y Squire (1977) incluyeron la apariencia de la línea M como una característica de las diferentes fibras musculares. En la fibras tipo I, la línea Z es más ancha y la línea M tiene cinco puentes lineales muy

Fibras tipo I



Fibras intermedias



Fibras tipo II

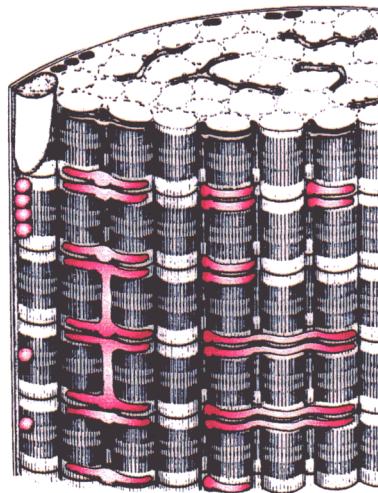


Figura 26.- Representación esquemática de la organización tridimensional mitocondrial en los tres tipos de fibras musculares esqueléticas. Modificado de Ogata y Yamasaki, 1985.

marcados. Las tipo IIa tienen líneas Z intermedias, tres puentes densos en la línea M y otros dos poco marcados. En las tipo IIb la línea Z es más estrecha, persisten los tres puentes marcados de la línea M y los otros dos son muy débiles o están ausentes (Sjöström y cols, 1982).

3.4.4.- Variaciones en el retículo sarcoplásmico.

Las cisternas del RS también presentan variaciones dependiendo del tipo de fibra, aunque según Shafiq y cols (1966), la cantidad de RS no puede ser utilizada como factor único de identificación. Las fibras rojas presentan una elaborada red de túbulos estrechos, localizada en la región de la banda H (Gauthier, 1970), mientras que en las tipo II se presenta como un empaquetamiento más compacto de túbulos anchos, dispuestos paralelamente. Para Ogata y Murata (1969a y b), este tipo de fibras siempre tiene más cantidad de retículo sarcoplásmico, incluso si se estudia en fibras poco desarrolladas (Figura 27).

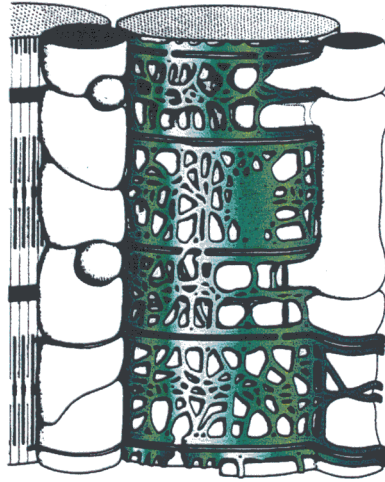
La acumulación de calcio en las vesículas sarcotubulares es idéntica en las fibras rojas y blancas y más baja en las fibras intermedias (Fiehn y Peter, 1971, Salvati y cols, 1983). Este hecho también se pone de manifiesto cuando al estudiar la oligomerización de la calsecuestrina, Maguire y cols. (1997) han demostrado que el sistema regulador de la concentración de Ca^{2+} es similar en funcionamiento en todas las fibras, pero con tendencia a acumular más en las fibras de contracción rápida.

3.4.5.- Variaciones en la placa motora.

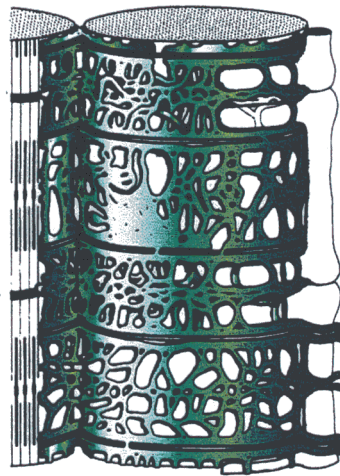
Siempre ha existido un confuso panorama en el análisis de las diferencias morfológicas y estructurales de la placa motora, dependiendo del tipo de fibra estudiado. El primero en aportar datos valorables fue Ogata (1965), que utilizando técnicas de acetilcolinesterasa y SDH, demostró cómo el aparato mioneural presenta un gran tamaño y desarrollo, con una complicada estructura, en las fibras blancas, mientras que en las fibras rojas era menor, menos complicado y bastante compacto. Las fibras intermedias presentaban características intermedias entre los dos tipos de fibras anteriores. Las hendiduras primarias son más numerosas, profundas, regulares y ramificadas en las fibras blancas que en las rojas (Ogata y cols, 1967; Ogata y Murata, 1969a y b). Lo mismo encontraron los demás investigadores en los nuevos datos que fueron aportando.

Los botones terminales fueron el objeto de estudio de Raberger (1971), en cortes teñidos con acetilcolinesterasa y Sudán negro B, determinando que su número era de 30-90 en las fibras blancas y de 1-5 en las rojas, presentando además un menor tamaño.

Fibras tipo I



Fibras intermedias



Fibras tipo II

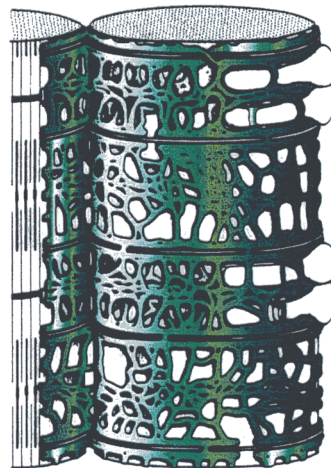


Figura 27.- Representación esquemática de la estructura tridimensional del sistema T y del RS en los tres tipos de fibras musculares esqueléticas. Modificado de Ogata y Yamasaki, 1985.

Las dimensiones del axón se consiguieron con tinciones de azul de metileno. En las fibras blancas es largo y con numerosas y diminutas varicosidades, mientras que en las rojas es corto y las varicosidades son grandes, aunque aparecen en menor número (Korneliussen y Waerhaug, 1973; Waerhaug y Korneliussen, 1974).

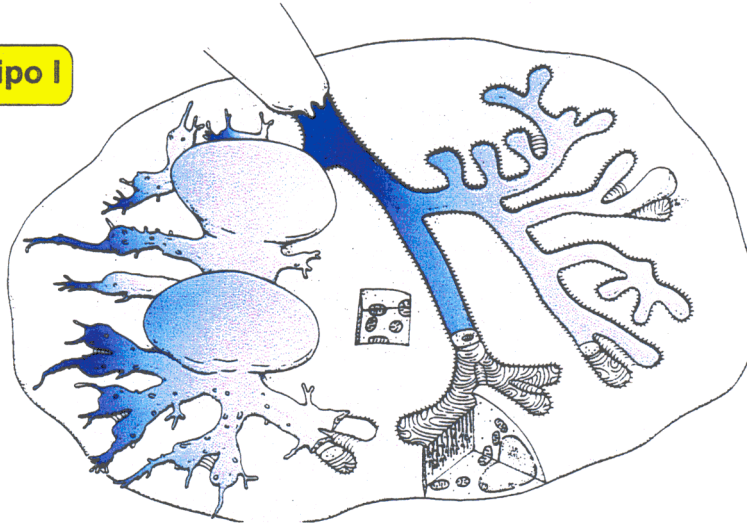
La determinación de la superficie axoplásmica corrió a cargo de Padykula y Gauthier, 1970), encontrando una considerable diferencia a favor de las fibras blancas (2,3), seguidas de las intermedias (1,5) y por último las intermedias (1). Posiblemente tan gran superficie es necesaria para transmitir el impulso nervioso en la rápida contracción de la fibra blanca (Murata y Ogata, 1969).

Los valores de longitud y superficie de membrana presináptica por cada axón terminal y de la proporción área mitocondrial / axón terminal, no resultaron estadísticamente significativas entre los tres tipos de fibras (Santa y Engel, 1973), así como tampoco la hubo entre las dimensiones de las vesículas sinápticas (Galvas y cols, 1982).

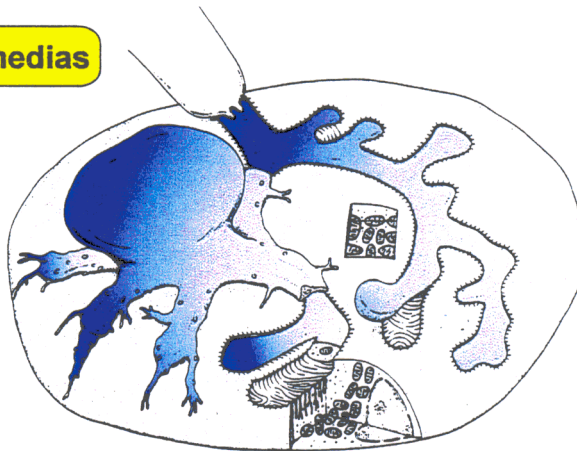
En la actualidad Ogata y Yamasaki (1984; 1985), mediante el microscopio electrónico de barrido, describen la estructura tridimensional de las placas motoras de los distintos tipos de fibras (Figura 28). La placa motora de las fibras blancas es alargada, las hendiduras sinápticas primarias contienen en su fondo pequeñas hendiduras secundarias. Las hendiduras primarias están separadas entre sí por crestas de sarcolema y pequeñas concavidades semiesféricas se encuentran a lo largo de su curso o en las regiones terminales. En la superficie de estas hendiduras aparecen las hendiduras secundarias, con un intervalo de 0,4 μm , dispuestas perpendicularmente al eje mayor de las primarias, aunque ocasionalmente pueden verse alineadas paralela u oblicuamente a éstas, especialmente en las ramificaciones. En las concavidades tienden a disponerse radialmente. Las hendiduras secundarias, son más numerosas, profundas y ramificadas, en las fibras blancas que en los otros tipos de fibras (Ogata, 1988). El nervio preterminal entra en la placa motora y se divide en tres o cuatro ramas en este tipo de fibra. El axón terminal es largo pero más delgado que en las fibras rojas o intermedias. Pequeños botones terminales se encuentran a lo largo del axón terminal, acabando dentro de las pequeñas concavidades semiesféricas de las hendiduras primarias. Dichos botones son más numerosos pero mas pequeños en las fibras blancas.

El número de células de Schwann varía dependiendo de la superficie de la placa, estando presentes en número de 3-4 en esta localización (Desaki y Uehara, 1981). Existen procesos citoplásmicos de estas células que cubren los canales de las hendiduras primarias, conteniendo en su interior el axón terminal. Estos procesos presentan pequeñas proyecciones digitiformes en sus zonas laterales y en las terminales que se sellan con la superficie del sarcolema (Ogata y Yamasaki, 1984).

Fibras tipo I



Fibras intermedias



Fibras tipo II

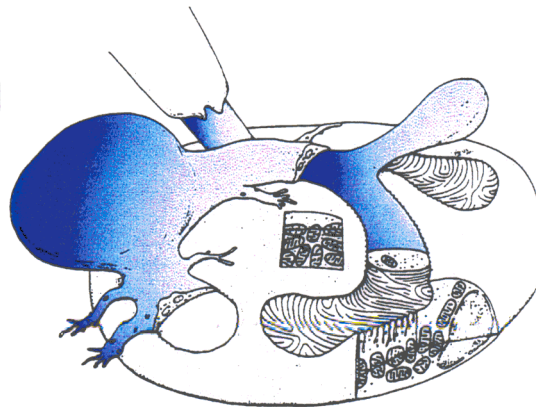


Figura 28.- Representación esquemática de la organización tridimensional de las placas motoras en los tres tipos de fibras musculares esqueléticas. Modificado de Ogata y Yamasaki, 1985.

Aunque la estructura básica tridimensional es la misma en todos los tipos de fibras, el conjunto morfológico de la placa motora de la fibra roja, es más simple y pequeño. Las hendiduras primarias abrazan anchas crestas del sarcolema situado en la parte central de la placa motora. Estas hendiduras son más anchas y cortas que las anteriores y a lo largo de su curso o en los terminales existen grandes pero escasas y poco profundas concavidades. La distancia entre las hendiduras secundarias es la misma que en las fibras blancas. Los axones terminales son más gruesos y cortos que en las fibras blancas. Así mismo los botones terminales que encajan en las hendiduras sinápticas son gruesos y menos numerosos. Normalmente en las fibras rojas encontramos una sola célula de Schwann, en la superficie de la placa motora. En cuanto al tamaño y estructura de la placa motora de las fibras intermedias, como ocurría en casos anteriores, se encuentran entre las fibras rojas y las blancas, aunque en su superficie solemos encontrar dos células de Schwann (Ogata y Yamasaki, 1985). Estos datos han sido corroborados posteriormente por Prakash y cols. (1996) y Siek y Prakash (1997), utilizando técnicas de inmunofluorescencia, combinadas con microscopía confocal.

3.4.6.- Variaciones en la vascularización.

Los primeros estudios se encaminaron a determinar el número de capilares por fibra, o por unidad de área (Hudlicka, 1973 y 1980). El tamaño de cada músculo puede suponer un inconveniente a la hora de establecer una relación entre la composición celular y el tamaño de los vasos que lo nutren, sin embargo, el número de capilares en la superficie de corte transversal, puede aportar información de importancia para conocer la fisiología capilar del músculo esquelético.

La clasificación de Ranvier (1874 a y b) en músculos blancos y rojos, estaba basada fundamentalmente en el grado de capilarización. Romanul y Pollock (1969), estudiaron en varias especies animales, incluyendo la humana, la relación existente entre el número de capilares y la capacidad oxidativa de la fibra muscular, demostrando diferencias entre los tipos ST y FT, de modo que la variación de tamaño influye sobre el número de capilares. Las fibras ST son de menor tamaño que las FT, con una densidad capilar más alta en las primeras.

En sujetos no entrenados, el área de aporte capilar puede ser del 20-30% mayor para fibras FTb y del 10-20% mayor para FTa, que para ST (Andersen, 1975. Andersen y Kroese, 1978. Aniansson y cols, 1981. Harri, 1977. Henderson y cols, 1970. Nygaard, 1981. Nygaard y Nielsen 1978. Saltin y cols, 1977). Los valores absolutos varían considerablemente entre diferentes personas y entre sus distintos músculos. Para Sjogaard (1982). (Esto es una comunicación personal pero no a mí), utilizando músculos en los que hubiera un claro predominio de un tipo de fibra muscular, el número de capilares varía de 1-4 en FT y 4-11 en ST.

La relación área fibrilar / área capilar, se estimó en 3:1 para ST y FT respectivamente (Gray y Renkin, 1978. Renkin y cols, 1981). En el hombre, para una medida de longitud capilar media de 1000 μm y un diámetro medio de 6 μm , lleva a una superficie transversal capilar de 0,62 cm^2/cm^2 de músculo, en un músculo con 330 capilares/ mm^2 . En músculos con predominio de fibras FT, este valor puede ser menor, y mayor si el predominio es de ST. Basados en valoraciones similares, el volumen capilar en el músculo esquelético humano sería aproximadamente del 1% del total. (Pappenheimer y cols, 1951. Aniansson y cols, 1981. Gray y Renkin, 1978. Mellander, 1981. Yamaki y cols, 1976).

4.- FISIOLÓGÍA.

4.1.- MECANISMO BÁSICO DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.

Como ya hemos dicho, la función del músculo es contraerse para desarrollar un trabajo mecánico. Esta contracción tiene lugar a partir del impulso nervioso, que proporciona la placa motora sobre la membrana de las células musculares, traduciéndose en un acortamiento de las sarcómeras. La concepción molecular de la contracción muscular, propuesta por Szent-Györgyi (1941), parece ser la que mejor se ajusta a la realidad del fenómeno, al considerar que la asociación-disociación de las moléculas de actina y miosina, constituyen las dos etapas de la contracción. Cada parte de la célula muscular participa en el proceso con una responsabilidad característica (Tabla XI) (Baldwin y cols., 1982).

Esta contracción muscular solo tiene lugar cuando la señal que procede de un nervio motor se transmite al músculo esquelético. Un impulso nervioso que llega a la terminación nerviosa de la placa motora, produce a nivel de la hendidura sináptica la rotura de las vesículas de AcCo y la liberación de un mediador. La AcCo liberada, se fija sobre una proteína de la membrana postsináptica, produciendo una modificación en la configuración espacial, que induce un aumento de la permeabilidad iónica (Heistracher y Hunt, 1969). Este hecho origina la aparición de un "potencial de placa motora", que a partir de un nivel crítico de despolarización, genera un potencial de acción (Figura 29).

Una vez producida la despolarización, la AcCo liberada en respuesta al estímulo nervioso, es rápidamente inactivada por una enzima específica, la acetilcolinesterasa, cuya presencia a nivel del sarcolema está demostrada por técnicas histoenzimáticas (Nakajima y Endo, 1973).

El potencial de acción determina, a nivel del sarcolema en la unión neuromuscular, la formación de una onda de despolarización que se propaga por la membrana (Thomas, 1972). La excitación y los cambios iónicos que la acompañan, es conducida al interior de la célula, a lo largo de las membranas de los túbulos T transversos y

posteriormente transferida a las cisternas contiguas del RS en cuestión de milisegundos. Las proteínas de unión del retículo con los túbulos T, sensibles al incremento de potencial de acción, se activan y hacen que algunos canales de liberación de calcio localizados a este nivel, se abran y de esta manera el Ca^{2+} concentrado en el retículo se libera, provocando con su aumento de concentración la puesta en marcha del resto de canales de liberación del Ca^{2+} , multiplicando la acción (Meech y Standen, 1975; Lunde y Sejersted, 1997).

COMPONENTE CELULAR	LOCALIZACIÓN PRINCIPAL	FUNCIÓN PRINCIPAL
Sarcolema	Membrana celular	Propagación del potencial de acción
Túbulos transversos	Invaginación de la superficie celular en sitios concretos en relación con las miofibrillas	Conducción del potencial de acción al interior de la célula (cisterna terminal)
Cisternas terminales	Subsarcolémicas adyacentes a los túbulos T	Liberadoras de Ca^{2+} al iniciarse la contracción
Miosina	Filamento grueso de la banda A de la sarcómera	Cataliza la degradación de ATP; interacciona con la actina para producir fuerza y acortamiento
Actina	Filamento delgado de la banda I de la sarcómera	Interacciona con la miosina para producir fuerza y acortamiento
Tropomiosina	Situada en los surcos del filamento de actina	Bloquea los lugares activos de la actina impidiendo el contacto con la miosina
Troponina	En localización específica en el filamento de actina	Complejo de proteínas reguladoras. Se une a la actina y troponina. Fija Ca^{2+} y libera los lugares activos de la actina al desplazar la molécula de tropomiosina

Tabla XI.- Localización de los distintos componentes de la fibra muscular y su principal función. Modificada de Baldwin y cols., 1982.

La concentración de calcio liberado desde la cisterna terminal del RS hacia el citosol, varía desde un nivel latente de aproximadamente 10^{-7} M hasta 10^{-5} M (Endo, 1977), suficiente para saturar las moléculas de troponina C, alojadas en los filamentos de actina. El calcio transportado por la troponina, provoca una modificación en la

configuración de la molécula de tropomiosina-actina, que a su vez capacita a la actina para interactuar con la cabeza de las moléculas de miosina integradas en el filamento grueso. Este mecanismo lleva a un estado llamado Mg^{2+} -ATPasa activado (Bagshaw y cols., 1975). La interacción de la actina con la miosina, supone un gasto de energía por conversión del ATP en ADP+P_i, catalizado por la miosina-ATPasa, que se traduce en un proceso mecánico, originario de una fuerza que puede o no producir el acortamiento de la fibra muscular (Sartorelli y cols., 1966) (Figura 30).

Para explicar el acortamiento de la sarcómera que se produce durante el proceso de contracción muscular, que aparece en respuesta al estímulo nervioso y a la despolarización que hemos descrito, se han postulado múltiples teorías, siendo la del "deslizamiento de filamentos" de Huxley y Hanson (1954), la aceptada como válida y comprobada posteriormente, tanto desde el punto de vista morfológico como bioquímico. La observación con microscopía óptica, hizo ver que la longitud de la sarcómera sufre variaciones entre un 20 y un 50%, según el músculo esté contraído o relajado, determinando variaciones en la configuración de algunas bandas. La longitud de la banda A permanece constante, así como la distancia entre la estría Z y el borde de la estría H. La banda I y la estría H disminuyen, pudiendo llegar a la desaparición completa en el punto de máxima contracción (Figura 31). Como ya dijimos anteriormente la transmisión de la señal es casi instantánea y por tanto todas las miofibrillas se contraen simultáneamente.

Los mismos cambios se observaron al microscopio electrónico. Durante la contracción, los filamentos finos se deslizan entre los filamentos gruesos hasta la mitad de la sarcómera, tirando de la estría Z, a la que están unidos y provocando la disminución en longitud total de la sarcómera. En la relajación, el solapamiento de los filamentos se reduce.

Esta teoría implica la existencia de puentes de unión entre los filamentos, con disposición simétrica respecto a la línea M. Al microscopio electrónico se puede observar como los filamentos de miosina presentan pequeños brazos laterales que entran en contacto con los filamentos contiguos de actina. Estos puentes de unión corresponden a las cabezas de la miosina-II, y es en esta zona o dominio motor, donde se encuentra la actividad ATPasa (Mornet y cols., 1981). Cada molécula de actina de un filamento es capaz de unir una cabeza de miosina-II, formando un complejo que polariza estructuralmente el filamento de actina. Las cabezas de miosina están orientadas en direcciones opuestas a cada lado de la zona central desnuda de los filamentos de miosina-II. La imagen superpuesta de las proyecciones laterales de cada cabeza de miosina tiene una apariencia de punta flecha a lo largo de los filamentos de actina. Como las cabezas deben interactuar con la actina en la región de solapamiento, los filamentos de actina deben tener polaridades opuestas a cada lado de la sarcómera (Higashi-Fujime, 1986). Todas las puntas de flecha de la miosina apuntan en dirección

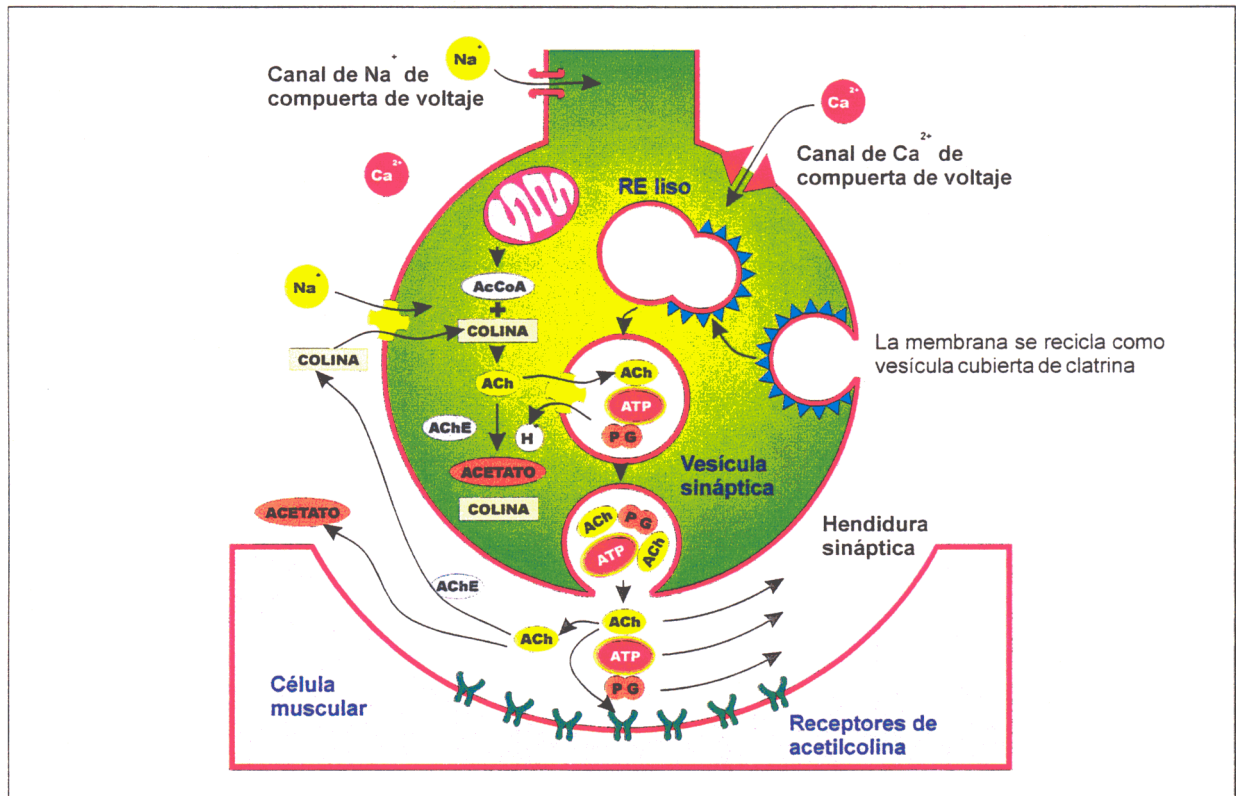


Figura 29.- Esquema de los procesos que tienen lugar a nivel de la unión neuromuscular durante la descarga de acetilcolina. Modificado de Katzung, 1989.

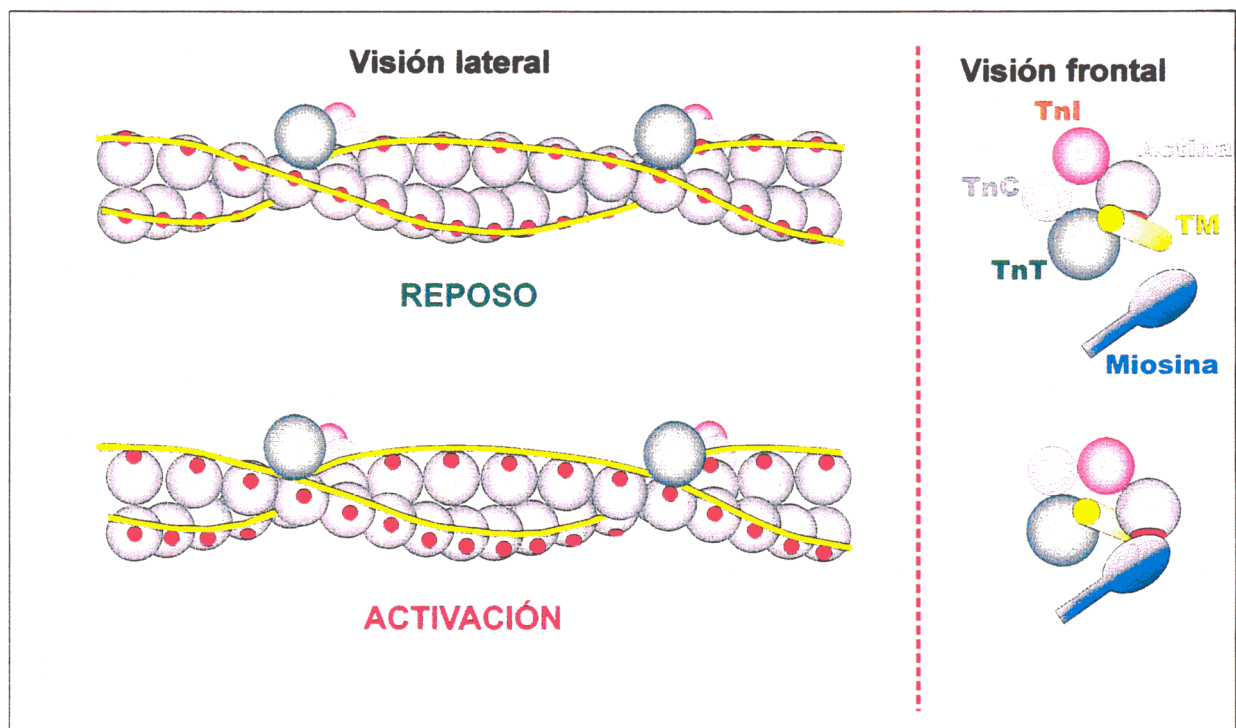


Figura 30.- Representación esquemática tridimensional del mecanismo de modificación en la configuración de la molécula de troponina-actina, que posibilita la interacción de la cabeza de miosina.

opuesta a las bandas Z. El extremo puntiagudo de esta configuración correspondería al extremo "menos" o de crecimiento lento, el extremo ancho correspondería al extremo "mas" o de crecimiento rápido. La unión de la molécula de actina con una cabeza de miosina-II forma un complejo de morfología regular y específica (Cooke, 1997).

El mecanismo bioquímico de la contracción sería el resultado de la hidrólisis del ATP y el camino de cada molécula de miosina en una única dirección a lo largo del filamento de actina adyacente. Este ciclo puede dividirse en cuatro fases (Hill y Hartree, 1920):

1º.- Fase de unión: Al principio del ciclo, una cabeza de miosina se une fuertemente a un filamento de actina, en una configuración de rigor. 2º.- Fase de liberación: Una molécula de ATP se une al surco de la parte mas alejada de la cabeza de actina, que libera el lugar de unión con la actina. Con esta disminución de afinidad, la cabeza está libre para desplazarse. 3º.- Fase de movimiento: La cabeza se cierra alrededor de la molécula de ATP, cambiando su morfología, provocando un desplazamiento de aproximadamente 5 nm., posteriormente se produce la hidrólisis del ATP en ADP y Pi (Lymn y Taylor, 1971). 4º.- Fase de generación de fuerza: La cabeza de miosina se fija mediante una unión débil a un nuevo lugar del filamento de actina, provocando la liberación de Pi y de esa manera se refuerza la unión provocando un golpe de potencia ya que la cabeza recupera su conformación original (Elliott y Offer, 1978). En este mismo momento se pierde el ADP y se inicia un nuevo ciclo en el cual encontramos a la cabeza de miosina íntimamente unida a la actina en configuración de rigor, pero desplazada en el filamento de la actina en relación con su posición al principio del ciclo (Bershitsky y cols., 1997). (Figura 32).

Este proceso no se lleva a cabo en todas las cabezas de miosina al mismo tiempo y por consiguiente las que están separadas del filamento de actina, sufren la acción de las otras que sí permanecen unidas y son arrastradas. Las 300 cabezas de cada filamento de miosina, en una contracción rápida realizan aproximadamente 5 ciclos por segundo (Thomas y cols., 1980) y de esta manera el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina alcanzan velocidades superiores a los 15 $\mu\text{m}/\text{sg}$.

Al terminar la contracción, la alta concentración de Ca^{2+} citosólico y unido a la troponina C, es bombeado de nuevo al interior del RS mediante la acción de una ATPasa dependiente de Ca^{2+} , presente en la porción longitudinal del retículo. En este proceso, la molécula de ATP es usada para recuperar dos moléculas de calcio. Este restablecimiento de niveles originales dura unos 30 msg. y de esta manera se establece nuevamente la posición de relajación de las moléculas que integran el filamento de actina de las miofibrillas (Tsugorka y cols., 1995). El complejo Mg-ATP-miosina debe ser restaurado a partir de la resíntesis de ATP, con un proceso metabólico complejo que se realiza tanto en el citoplasma, como en la mitocondria (Chance y Williams, 1956).

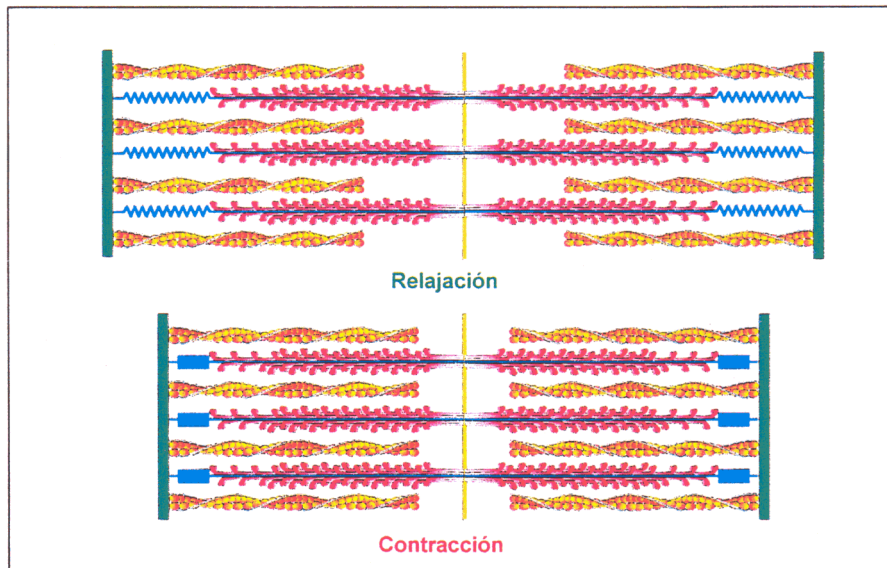


Figura 31.- Representación esquemática de los estados fundamentales de las sarcomeras durante el proceso mecánico de la contracción.

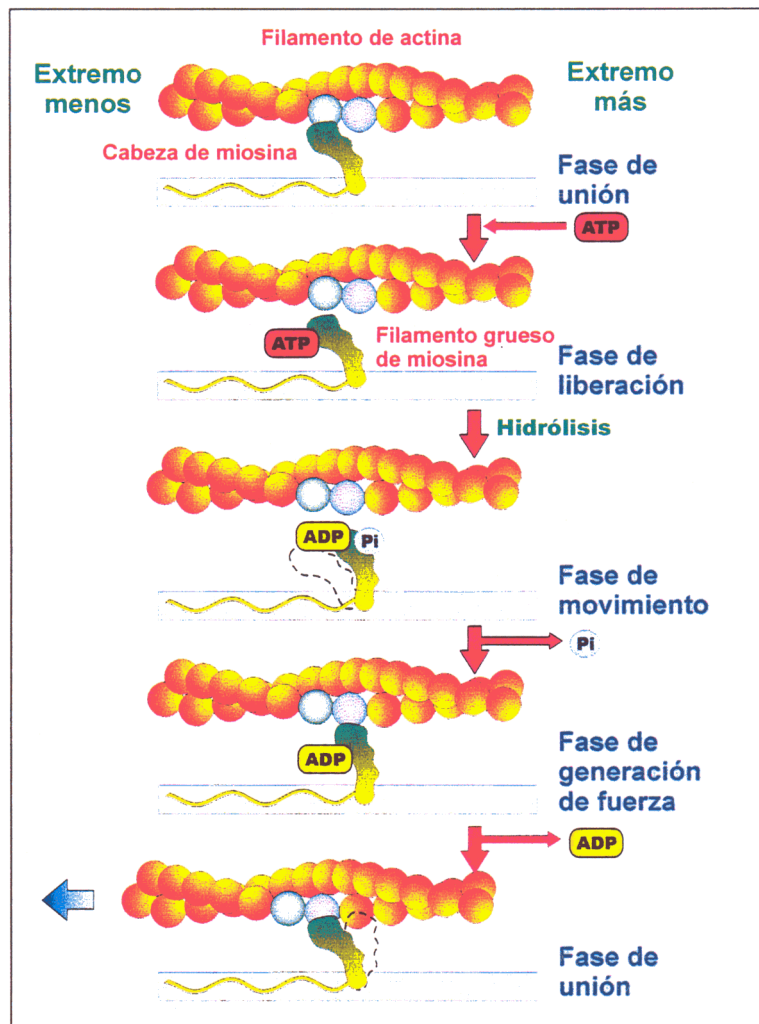


Figura 32.- Fases del mecanismo íntimo de la contracción, la miosina camina sobre la actina.

4.2.- PRODUCCIÓN DE ENERGÍA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

4.2.1.- Almacenamiento de alta energía.

La molécula principal de recambio energético en todo el ámbito de la biología, es el ATP. En el músculo esquelético se presenta solo pequeñas cantidades, de 5 a 7 $\mu\text{moles/gr.}$, por lo que constituye una reserva mínima para su utilización en la producción de fuerza y trabajo mecánico mantenido. Por ello, la célula muscular debe estar equipada con mecanismos enzimáticos que sean capaces de proporcionar continua y rápidamente nuevas moléculas de ATP para ser utilizadas durante la contracción.

Dentro de este primer eslabón de almacén de energía, podemos incluir compuestos de fosfato altamente energéticos, como la fosfocreatina, sobre la que actúan enzimas del tipo de la creatina fosfoquinasa, que cataliza la transformación de ADP en ATP por una sencilla reacción, y que se presenta en abundancia en las fibras musculares. Aun así, su concentración es limitada entre 15 y 20 $\mu\text{mol/gr.}$ y las reacciones químicas que involucran el metabolismo de este sustrato básico de reserva, no constituyen un seguro en el mantenimiento de la actividad (Shriver, 1986). Por tanto, hemos de pensar en un almacenamiento de sustratos que sean los que en periodos largos de actividad, van a mantener la contracción muscular.

4.2.2.- Almacenamiento de sustrato energético.

Las reacciones químicas que se originan en la célula muscular, para conseguir ATP suficiente para llevar a cabo su función, pueden tener lugar con o sin aporte continuo de oxígeno, de forma que existe una vía aerobia y otra vía anaerobia, con evidente diferencia en el rendimiento de cada una. Durante el movimiento, en el que participan diversos grupos de músculos que no trabajan al unísono y con tiempos variables, desde segundos a horas, la incorporación de O_2 al individuo es de importancia clave para conseguir energía al ser utilizado por las mitocondrias (Billeter y Hoppeler, 1994).

En la actualidad existe el acuerdo de que la circulación central limita la incorporación máxima de O_2 , existiendo una elevada correlación entre el máximo de O_2 necesario, el gasto cardíaco máximo y la concentración de O_2 en sangre arterial (Astrand, 1990). Evidentemente, el potencial de las mitocondrias para consumir O_2 , normalmente excede la capacidad de la circulación para proporcionarlo. Saltin y Rowell (1980) calculó que el potencial del músculo esquelético humano en términos de flujo sanguíneo es de 2,0 a 2,5 l/Kg/min en condiciones normales.

En el ejercicio prolongado, la disponibilidad de sustratos para el metabolismo de consumo de O_2 es otro factor a considerar. El sustrato primario inmediatamente utilizable en nuestro caso, es el glucógeno. El músculo esquelético humano puede almacenar una cantidad variable de glucógeno, entre 10 y 15 mgr/gr, dependiendo de la dieta y la actividad básica. Durante la contracción las enzimas reguladoras, fosforilasa y fosfofructoquinasa (PFK), son activadas para metabolizar el glucógeno a ácido pirúvico. Estas primeras transformaciones son rápidas, pero consiguen un bajo rendimiento de ATP, y es en los pasos siguientes del metabolismo de piruvatos en las mitocondrias donde se generan cantidades relativamente grandes de ATP, con producción de CO_2 y H_2O , propias del metabolismo oxidativo (Tabla XII). La capacidad de oxidación del piruvato es dependiente en primer lugar del número de mitocondrias presentes en cada tipo de fibra (McDougall y cols., 1979). En algunos casos, la capacidad para glucogenolisis es mucho mayor que la capacidad de las mitocondrias en metabolizar el piruvato, generalmente por falta de aporte de oxígeno. En estas condiciones el piruvato se convierte en lactato en el citoplasma y se lleva a cabo su metabolismo por vía anaerobia (Robinson y cols., 1994).

<i>I.- Reacción principal en la utilización del ATP</i>	
$ATP \xrightarrow[\text{Miosin-ATPasa}]{\text{RS-ATPasa}}$	$ADP + Pi \text{ (liberación de energía)}$
<i>II.- Síntesis de ATP por vía aeróbica</i>	
a.- $ADP + \text{Fosfocreatinina} \xrightarrow[\text{fosfoquinasa}]{\text{Creatinín}}$	$ATP + \text{Creatinina}$
b.- $2 \text{ ADP} \xrightarrow{\text{Mioquinasa}}$	$ATP + AMP$
c.- $\text{Glucógeno} + 3 \text{ ADP} \longrightarrow$	$2 \text{ Piruvato} + ATP$
<i>III.- Reacción principal mitocondrial en la síntesis de ATP</i>	
a.- $2 \text{ Piruvato} + 6 \text{ O}_2 + 36 \text{ ADP} \longrightarrow$	$6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + 36 \text{ ATP}$
b.- $\text{Palmitato} + 23 \text{ O}_2 + 130 \text{ ADP} \longrightarrow$	$16 \text{ CO}_2 + 16 \text{ H}_2\text{O} + 130 \text{ ATP}$

Tabla XII.- Resumen del metabolismo estequiométrico de la síntesis y degradación de ATP en el músculo esquelético. Modificada de Baldwin y cols., 1982.

La mayoría de las fibras también utilizan glucosa exógena, que se provee por vía sanguínea supletoria. Sin embargo, en el músculo esquelético, el consumo de glucosa es relativamente bajo, en relación al glucógeno consumido, lo que lleva a tener muy en cuenta el estado del depósito de glucógeno cuando el músculo va a ser utilizado en un trabajo intenso, como pueden ser las pruebas deportivas (Viru, 1994). Esta regulación del metabolismo de los carbohidratos durante el ejercicio, será discutida en detalle en capítulos siguientes.

En un estado de baja concentración de este primer sustrato, el músculo esquelético también puede metabolizar ácidos grasos. Hay dos fuentes primarias de ácidos grasos relacionados con el músculo. La primera implica el almacenamiento de triglicéridos endógenos en la fibra muscular y la segunda, el de ácidos grasos y triglicéridos en el tejido adiposo. Estas fuentes dependen del transporte sanguíneo al músculo para su utilización. La movilización y oxidación de ácidos grasos es compleja y las reacciones implicadas tienen su base en la Tabla XII.

Los diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas, poseen distinta capacidad para utilizar ambas vías metabólicas, aeróbica o anaeróbica, desde el sustrato básico. El entrenamiento, en su sentido más amplio, proporciona a cada fibra una forma óptima, capacitándola, para el proceso metabólico oxidativo mantenido, con un mayor rendimiento de ATP por unidad de sustrato metabólico.

4.3.- PROPIEDADES FÍSICAS DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.

Desde el primer momento hemos hablado de la función muscular como el resultado de la transformación de energía química en energía mecánica, es decir, en la realización de un trabajo, con todas sus características físicas conceptuales, modificadas por las características fisiológicas del organismo en el que se lleva a cabo el proceso (Huxley, 1988). De esta forma, se puede plantear su estudio desde diferentes puntos de vista, como puede ser el físico, fisiológico, médico, deportivo, psicológico etc., con un resultado muy complejo. A esta complejidad se une además la del elemento integrador, el sistema nervioso, aun más difícil de estudiar y controlar funcionalmente.

La riqueza de manifestaciones de la fuerza humana, es la consecuencia de tener en cuenta una serie de particularidades del músculo, en cuanto a su capacidad de desarrollar fuerza. En primer lugar, el rendimiento de la transformación de energía química en energía mecánica, que se cifra en un 20-30%; por otra parte, el proceso de contracción, que entraña la acción simultánea de muchas sarcómeras sincronizadas, en muchos músculos organizados, en acción conjunta entre protagonistas, agonistas y antagonistas. Tampoco se puede olvidar la disposición espacial de las células musculares, de sus vainas y cubiertas de tejido conjuntivo, de sus tendones y puntos de inserción. Con todo esto, se nos ofrece un vastísimo espectro de variaciones mecánicas, que tendríamos que considerar si el estudio se hiciese desde un punto de vista físico.

Nuestra valoración debe plantearse desde un punto de vista fisiológico, que nos permita relacionar las propiedades de la fuerza que desarrolla el músculo, con el trabajo realizado, y los fenómenos de contractilidad-velocidad, con el concepto de carga-velocidad, pero simplificando al máximo el análisis, para no olvidar el enfoque esencialmente morfoestructural del trabajo que nos ocupa.

4.3.1.- Propiedades mecánicas.

Por definición, una **fuerza** es la causa capaz de producir o modificar el estado de reposo o de movimiento de un cuerpo o de originar una deformación en él. En este concepto se aprecia una doble vertiente, por un lado dinámica, en cuanto a la capacidad de producir una aceleración en un cuerpo, y por otro estática, en cuanto a la capacidad de producir una deformación.

Desde el punto de vista fisiológico, la definición de fuerza puede considerarse como la tensión que un músculo puede oponer a una resistencia en un solo esfuerzo máximo. La fuerza muscular es absoluta, cuando medimos el valor máximo de la fuerza que puede desarrollar un músculo, en un movimiento dado, y es relativa cuando consideramos el cociente entre la fuerza muscular y el peso corporal del individuo. Dentro de este concepto general existen variaciones que contemplan aspectos o propiedades de esta fuerza: a) Fuerza máxima estática, es la mayor fuerza que el sistema neuromuscular puede ejercer voluntariamente, contra una resistencia imposible de vencer. Si la tensión que se origina es activa, las fuerzas externas actúan sobre el músculo en esfuerzo provocando una distensión. b) Fuerza máxima dinámica, es la mayor fuerza que el sistema neuromuscular puede realizar voluntariamente, durante el movimiento. Dependiendo de la velocidad a la que se vence la resistencia puede ser explosiva, rápida o lenta. Estas dos variantes de acción, que permiten desarrollar la fuerza máxima, llevaron a dividir todos los ejercicios en dos grandes grupos, ejercicios de fuerza-velocidad y ejercicios de fuerza-resistencia (López de Rego y Villalón, 1989).

El **trabajo** es otro concepto en relación con las propiedades mecánicas que estamos valorando que nos habla de un rendimiento, de una energía utilizada para que la fuerza produzca un desplazamiento. Y si además consideramos el trabajo en unidad de tiempo, estamos estudiando otra de las propiedades fisiológicas fundamentales en el músculo, como es la **potencia**. Es importante la inclusión del factor tiempo, porque la máxima potencia de músculo vendrá dada por la realización del mayor trabajo, en el menor tiempo posible. (Bershitsky y cols., 1997).

La potencia del músculo está referida por tanto, a la capacidad de generar fuerza (tensión), cuando se estimula para la contracción. En la longitud de reposo, el músculo es capaz de desarrollar una tensión máxima por unidad de material contráctil, que en el humano es de 3 a 4 Kgr/cm² de área de sección transversal (Roy y cols., 1982). Tanto la tensión que desarrolla el músculo cuando se contrae isométricamente (tensión total), como la tensión ejercida por el músculo no estimulado, varían con la longitud de la fibra muscular. La tensión activa es la diferencia entre estos dos valores, para una longitud dada (Huxley y Peachey, 1961).

La resistencia se refiere a la capacidad del músculo para mantener determinada cantidad de fuerza o repetirla en contracciones seguidas. Esta capacidad se relaciona con su efectividad en el mantenimiento de la energía para soportar el proceso mecánico de la contracción (Adrian y cols., 1969).

El último dato a tener en cuenta es la **elasticidad** del músculo, que es la capacidad para recuperar la forma original, una vez que ha sido sometido a una deformación. Esta propiedad puede hacer que actúen como acumuladores de fuerza al ser estirados por músculos antagonistas o fuerzas externas, capaces de liberar de nuevo esa energía, aumentando la fuerza al realizar la contracción. Esta elasticidad es imprescindible para garantizar el movimiento fino y continuo y es capaz de absorber la energía de traumatismos directos e indirectos para prevenir la aparición de lesiones (Takemori y cols., 1996).

4.3.2.- Tipos de contracción muscular.

Los diferentes resultados que se obtienen con la contracción de un músculo, están en función de que se produzca o no un desplazamiento de alguna parte del aparato locomotor. También pueden producirse contracciones diferentes y simultaneas, de forma que se realice un determinado trabajo y al mismo tiempo, se contrarreste el efecto de la gravedad sobre el cuerpo manteniendo la postura.

Cuando la contracción produce un acortamiento del músculo, se denomina **contracción anisométrica** (diferente medida). Se realiza contra una carga constante, con aproximación de los extremos del músculo, es decir, hay acortamiento y desplazamiento. Dependiendo de la cantidad de fibras que se contraen a lo largo de la línea articular, pueden ser a su vez **isodinámicos**, cuando el número de fibras musculares comprometidas permanece constante de principio a fin de movimiento, o bien **alodinámicos**, cuando el número de fibras contráctiles es mayor en el punto de la línea articular y menor en el resto de los ángulos articulares. Cuando el vector desplazamiento es del mismo sentido que la fuerza generada, se produce un trabajo positivo y la contracción se llama **concéntrica**, isotónica o dinámica, pero cuando el desplazamiento y la fuerza son vectores opuestos, por ejemplo, una fuerza externa frenada por el músculo, el trabajo es negativo y la contracción se llama **excéntrica**, el músculo se alarga mientras se desarrolla tensión. Dentro de este grupo también se considera la contracción **isocinética** o contracción a velocidad constante, con tensión máxima en todos los ángulos del movimiento (Gulati y Podolsky, 1981).

La **contracción isométrica** (igual medida) o estática, es aquella en la que el músculo desarrolla una tensión, pero no hay acortamiento ni desplazamiento, de forma que la longitud total del músculo no varía, debido a sus propiedades mecánicas y viscosas. El trabajo se produce en este caso por deformación, pero no hay trabajo

mecánico. Este tipo de contracción mantiene el tono postural contra la acción de la gravedad (Edman, 1979).

4.3.3.- Velocidad de contracción.

La velocidad de contracción se refiere al tiempo que tarda un músculo en desarrollar una fuerza. Esta velocidad varía en relación inversa a la carga. A una carga dada, la velocidad es máxima en la longitud de reposo y declina si el músculo está alargado o acortado.

La relación fuerza-velocidad se describe como la habilidad muscular para realizar una función o la fuerza que se genera durante una determinada contracción isotónica. Esta relación es hiperbólica para todos los tipos de fibras. Cuando la carga se incrementa, la velocidad de acortamiento disminuye y viceversa. Para cualquier tensión, los músculos de contracción rápida pueden generar mayor velocidad de acortamiento que los de contracción lenta. Cuando ambos tipos de músculos se contraen a la misma velocidad, los de contracción rápida generan una cantidad de fuerza relativamente mayor que los de contracción lenta. Estos factores son importantes al considerar el uso de los diferentes tipos de músculos, para ejercer actividades que requieren diferentes facultades (Spector y cols., 1980).

La longitud de un músculo dado y el mayor alineamiento paralelo de sus fibras, aumenta su capacidad de acortamiento. Esto ocurre principalmente, porque hay más sarcómeros dispuestas en serie, según la dirección del movimiento. La ruptura de las fibras musculares, se presenta cuando se estira tres veces por encima de la longitud de equilibrio (relajado y sin inserciones).

4.3.4.- Rendimiento de la contracción.

El rendimiento de la fuerza de un músculo, puede variar por dos vías: aumentando el número de estímulos, o reclutando nuevas unidades motoras (Hill, 1922). En el primer caso, se consigue un aumento de fuerza con el entrenamiento, que está relacionado con la habilidad de un músculo en mantener determinado rendimiento contráctil o de repetirlo en contracciones seguidas. Cualquier programa de acondicionamiento físico destinado a mejorar la función mecánica del músculo, debe considerarse atendiendo a las propiedades anteriormente expuestas (potencia y resistencia). La capacidad generada en el entrenamiento se expresa en términos de fuerza y velocidad de contracción (Baldwin y cols., 1982).

Refiriéndonos a un aumento de rendimiento por el reclutamiento de nuevas fibras, sabemos que para la mayoría de las actividades, no todas las fibras que componen un determinado músculo son estimuladas en cada contracción. La proporción de fibras

reclutadas, puede depender del grado de inervación, es decir, el número de neuronas que controlan las fibras, que son activadas por el sistema nervioso. El reclutamiento de unidades motoras, depende pues, del incremento del esfuerzo voluntario, y el gradiente de respuesta muscular, depende del número de motoneuronas activadas (Allinger y cols, 1996).

4.3.5.- Estímulo nervioso.

En cuanto a la respuesta eléctrica al estímulo nervioso, sabemos que el potencial de reposo de la membrana del músculo esquelético es aproximadamente de -90 mv. El potencial de acción dura de 2 a 4 mseg. y es conducido a lo largo de la célula muscular, a una velocidad aproximada de 30 m/seg. El periodo refractario absoluto, dura de 1 a 3 mseg. y las polarizaciones tardías, incluyendo los cambios de umbral para la estimulación eléctrica, son relativamente largos (Eisemberg y Kielley, 1972).

La cronaxia o tiempo de aplicación de una corriente de intensidad doble de la necesaria (reobase) para producir un estímulo, es un poco más elevada que la del nervio. Existen diferencias en los umbrales de excitación de diferentes tipos de fibras. El tamaño del potencial de acción registrado en un músculo total, es proporcional a la intensidad de la corriente estimulante entre la del umbral y las intensidades máximas de corriente.

El mecanismo contráctil no tiene periodo refractario y la estimulación repetida antes de que aparezca una relajación, provoca la activación adicional de los elementos contráctiles y por consiguiente una respuesta que se agrega a la contracción ya presente. La tensión desarrollada en este caso es considerablemente mayor. Cuando la repetición de estímulos no deja periodo de relajación de la fibra, se altera el proceso de secuestro y liberación de Ca^{2+} y miosín-ATPasa, conduciendo a una contracción tetánica, cuya tensión es cuatro veces mayor que la contracción simple (Baldwin y Winder, 1977 y Tsugorka y cols., 1995).

Para Spector y cols. (1980), los músculos de contracción rápida, pueden soportar una sacudida muscular (contracción-relajación para un solo potencial de acción) cada 7,5 mseg y alcanzan el tope de fuerza tetánica con frecuencias de estimulación altas, mientras que los músculos de contracción lenta, con sacudidas cada 100 mseg, llegan a alcanzar la tensión tetánica con frecuencias de estimulación baja. Sin embargo, el estudio "in vitro" de cada tipo de músculo lento o rápido en contracción, referido a la unidad de área transversal, da igual umbral de tensión tetánica (Baldwin y cols., 1982 y Ruff, 1996).

Todos estos factores afectan la respuesta de contracción independientemente de las propiedades bioquímicas que regulan los mecanismos contráctiles, pero los datos

morfoestructurales del músculo deben ser siempre considerados cuando se evalúa su papel funcional al preparar actividades variadas.

5.- VARIACIONES EN EL TEJIDO MUSCULAR ESTRIADO ESQUELÉTICO CON EL EJERCICIO.

Todos los datos aportados hasta el momento, nos hablan de la gran plasticidad de este tejido y de su alta capacidad de adaptación, según los requerimientos impuestos por las distintas actividades mecánicas a las que se ve sometido el organismo. En nuestro caso concreto, ante los diferentes entrenamientos que debe practicar un atleta, vemos cómo esta plasticidad puede traducirse ampliamente, desde los poderosos músculos de un levantador de pesas, hasta la alta resistencia a la fatiga de los músculos de un corredor de maratón. Estas diferencias vienen marcadas por los cambios durante el entrenamiento.

En la actualidad se considera que las variaciones que el músculo experimenta durante el ejercicio, forman parte de un proceso normal de crecimiento del tejido y del individuo, por tanto, los estudios sobre el modo en que se produce el incremento en las fibras musculares, quedan solapados por el estudio de un proceso normal del desarrollo.

5.1.- CRECIMIENTO DE LA FIBRA MUSCULAR.

Ya desde 1897, Morpurgo viene apuntando la hipertrofia de las fibras musculares como respuesta a un entrenamiento para el ejercicio, aunque él lo atribuía a un incremento total del sarcoplasma. A partir de estudios bioquímicos (Helander, 1961) y citológicos (Goldspink, 1964), vemos cómo el trabajo inductor de la hipertrofia, en nuestro caso el ejercicio, está asociado normalmente a un gran aumento del material miofibrilar de la célula, fabricado fisiológicamente, para conseguir mayor fuerza de contracción del músculo.

De todos es conocido que la capacidad del músculo para desarrollar fuerza por unidad de área es constante, y por tanto, la cantidad de fuerza muscular producida, depende directamente del tipo y número de sarcómeras en serie que aparecen en la fibra muscular, es decir, de las medidas en longitud y superficie transversal de las miofibrillas (Ikai y Fukunaga, 1970), imponiéndose la necesidad de conocer cómo se producen estos cambios durante el crecimiento y en relación al ejercicio.

El incremento fisiológico del tamaño de un músculo, en relación a su peso, aparece en los primeros estadios postnatales, viendo cómo el bíceps braquial, con un peso inicial de 20 gr, llega a conseguir 110-150 gr en el adulto (Fleury y cols., 1960). El peso total del músculo, utilizado por estos autores, como método simple para estimar los cambios de composición, les llevó a definir que el aumento absoluto del tamaño de

un músculo depende de su función y de su localización en el esqueleto. En planteamientos similares, Alway y cols (1989) comparan las variaciones de aumento de peso muscular en hombres y mujeres culturistas, con respecto a un grupo control sedentario, determinando que el aumento en el número de Kgr/masa corporal, es de un 35% mayor en el grupo masculino. Iwaoka y cols (1989) estudian la diferencia de peso muscular entre un grupo de atletas de edad avanzada, que han mantenido el entrenamiento durante toda su vida, viendo que presentan un peso muscular 58,2% mayor que el grupo control de la misma edad. Hortobagay y cols. (1993) apuntan la labilidad de este parámetro. al valorar el peso de atletas de diferentes deportes, que abandonan el entrenamiento, sólo durante 15 días, viendo que disminuye una media de 2,6% del peso inicial.

De este peso, el 85% corresponde a las fibras musculares y su aumento está confinado a alteraciones en el sistema miofibrilar, así como a cambios en las mitocondrias y RS, directamente implicados en la contracción muscular. El 15% restante corresponde a material extrafibrilar, implicado también en los cambios indicados (Kobayashi y Yonemura, 1967). Su composición varía, desde un 90% en agua en el músculo fetal, un 78,5% entre los 4 y 7 meses y un 76% en el adulto. El aumento de proteínas, que a las 14 semanas de nacimiento llegan a 2,8 veces y 3,5 veces en el adulto, está reflejado sobre todo en el incremento de la fracción fibrilar (Ling y Kromash, 1967).

La síntesis de proteínas fibrilares no se produce sólo durante el trabajo muscular. Carraro y cols. (1990) han planteado sus variaciones en el ejercicio aerobio, valorando la excreción en orina de la 3-metilhistidina y el nitrógeno total. Ellos determinaron que este tipo de ejercicio estimula la síntesis hasta 4 h después de terminar el entrenamiento, durante el periodo de recuperación. Recientemente, Neuffer y cols. (1996), con estimulación eléctrica continuada, han determinado un llamativo aumento de RNAr y RNAm para proteínas que intervienen en la adaptación de la mayor demanda metabólica muscular al ejercicio, hasta niveles de 50 veces más que en reposo, durante las 24 horas siguientes al inicio de la estimulación y con niveles de proteínas de hasta 10 veces su valor normal, hasta 21 días después de terminar la estimulación.

En la década de los 80, una serie de investigadores hicieron notar que en las primeras fases de estimulación muscular por entrenamiento deportivo, aparecen en el tejido muscular lesiones puntuales, que después de poco tiempo desaparecen, a la vez que empieza el periodo de crecimiento de las células musculares, ya sea por hipertrofia, como por hiperplasia. En esta línea, Malcon y cols. (1983), utilizando estimulación eléctrica sobre músculos de contracción rápida en el pollo, empiezan por mostrar cambios en el RS, incremento en la cantidad de enzimas oxidativas, cambios en la regulación de proteínas y finalmente, predominio de expresión de isoformas lentas de miosina, que poco a poco sustituyen a las originales. Estos mismos autores, apuntan la

posibilidad de un control citoplásmico adicional, para traslación de RNAm de MLC-3f. Posteriormente Studitsky y cols. (1985), siguieron un protocolo similar en cuádriceps femoral de rata, y concluyen que la destrucción inicial tiene lugar en las fibras rojas, manifestándose por alargamiento del sistema T y elementos del RS, matriz mitocondrial hinchada, destrucción de crestas, degeneración vacuolar de parte de las mitocondrias y destrucción de miofibrillas individuales. Posteriormente sufre una acumulación de mitocondrias bajo el plasmalema, en las que pueden verse divisiones, indicando ya una recuperación, transformación de células satélites en mioblastos y presencia de centriolos en las células endoteliales.

En la misma época, Seene y cols (1986) hablan ya de un cambio en la proporción los diferentes tipos de proteínas de distintos tipos de músculos de ratas sometidas a un ejercicio intenso, siguiendo un proceso de adaptación a la actividad funcional aumentada, con rápida redistribución de aminoácidos. Ellos detectan un aumento de la actividad autocatalítica y acumulación de proteasas alcalinas, asociadas a fracciones microfibrilares, a la vez que disminuye la síntesis de MHC y aumenta paralelamente la de MLC. También detectan un cambio de miosina más rápido en los músculos tónicos y plantean la alternancia de síntesis como una reacción compensatoria, para mantener las propiedades contráctiles del músculo durante el ejercicio.

En el músculo humano se estudiaron también estos cambios iniciales inducidos por el ejercicio, aceptando como los mejor planteados los realizados por Sjöström y cols. (1987), detectando una degeneración-regeneración de las fibras tipo II, patología neuromuscular y signos de daño en nervios periféricos tras el ejercicio excéntrico mantenido. Estos cambios no aparecen en todos los casos, sino solo cuando hay un cambio brusco de actividad, cuando el ejercicio se mantiene hasta la fatiga o cuando el entrenamiento es extremadamente intenso, apuntando que en todos los casos aparece un tejido conjuntivo más abundante y con algunas células propias de procesos inflamatorios en esta localización, que además imponen un compromiso importante al aporte sanguíneo, por compresión vascular.

5.1.1.- Crecimiento longitudinal de las miofibrillas.

Los primeros datos aportados en cuanto al crecimiento en longitud de la fibra muscular (Gordon y cols., 1966), demostraron que la fuerza que el músculo puede desarrollar, depende del grado de solapamiento de los filamentos finos y gruesos y, que esta longitud óptima de la sarcómera es aquella con la que se consigue la interacción máxima entre los puentes de los filamentos de miosina con la actina. Por tanto, el crecimiento en longitud nunca podría implicar un simple alargamiento de la sarcómera, sino un aumento en el número de ellas, manteniendo la longitud óptima para desarrollar la fuerza requerida. Este nuevo enfoque fue desarrollado por Goldspink (1968), indicando que el crecimiento longitudinal posterior de las miofibrillas, está asociado a un

incremento en el número de sarcómeras en serie. Posteriormente Williams y Goldspink (1971) lo confirmaron en diferentes especies de vertebrados, al contar el número de sarcómeras en las diferentes edades, para cada especie considerada.

Paralelamente Goldspink, Larson y Davies (1970) utilizando aminoácidos o adenosina marcados radiactivamente, determinaron por autorradiografía, que el punto en el que se produce el crecimiento de la miofibrilla por nueva adición de sarcómeras, es el final de la fibra, en la que aparecen nuevas bandas marcadas radiactivamente. Estos mismos autores muestran con microscopía electrónica, cómo en la región de la unión miotendinosa aparece una zona muy marcada de crecimiento, con un gran aumento de polisomas, que indican síntesis proteica citoplásmica, próximos a filamentos libres formados, que se van acoplado al extremo final de la miofibrilla.

Rosser y cols. (1995) estudian la expresión de las miosinas en los extremos puntiagudos de las fibras y ven cómo hay un significativo aumento de MHCneo en estas localizaciones, que no aparece en otras zonas de la célula y que según se va alejando del extremo, empiezan a detectarse la presencia de neurotransmisores de acetilcolina, paralelamente a la presencia de MHCadulto. También hay un aumento de la actividad mitótica en células satélites de los extremos de las fibras, y un aumento de captación de aminoácidos y síntesis de proteínas, durante las dos primeras semanas de entrenamiento para velocidad (Tamaki y cols. 1997).

Para estudiar cómo variaba este número de sarcómeras asociadas de nuevo, Tabary y cols. (1972), Tardieu y cols. (1977) y Williams y Goldspink (1978), utilizaron protocolos con animales inmovilizados, y así vieron que la disminución en el número de sarcómeras varía, dependiendo de que la inmovilización se produzca con el músculo en estiramiento o en acortamiento, con una disminución mayor para el segundo caso. Al retirar la inmovilización el número de sarcómeras volvía rápidamente a la normalidad, en un proceso completamente reversible.

Además de este crecimiento en longitud, Russell y cols (1992) proponen una remodelación constante que mantiene la integridad de la fibra. Por medio de isótopos radiactivos, marcadores inmunológicos e hibridación "in situ", ven como hay una distribución intermiofibrilar y no sarcomérica de moléculas de RNAm para miosinas, que mantiene los cambios de la reserva de monómeros de miosina. Recientemente Fowler y cols (1993) han aportado nuevos datos muy complejos sobre el control de la longitud de los filamentos finos por medio de una proteína, la tropomodulina, que en un principio estaba identificada en eritrocitos humanos y ellos han localizado en el músculo. Esta molécula fija dos de sus unidades a otras dos moléculas de tropomiosina terminal del filamento fino, en el extremo contrario a la línea Z, bloqueando o liberando el crecimiento en el extremo final.

5.1.2.- Crecimiento transversal de las miofibrillas.

Pero el músculo no solo crece en longitud, también la superficie de corte de cada uno aumenta con el ejercicio y está generalmente aceptado, que no lo hace a expensas del aumento en el número de células, que se mantiene constante tras completarse el desarrollo embrionario (McCallum, 1898; Rowe y Goldspink, 1969; Stickland y Goldspink, 1973; Rosser y cols, 1995), sino que es debido al aumento en el número de miofibrillas de cada célula. Este hecho lo había apuntado ya Heidenhein en 1913, aunque no pudo ser confirmado hasta la utilización del microscopio electrónico.

El examen histológico de cortes de músculo en los últimos de la vida fetal, no revelan ninguna actividad mitótica o de crecimiento en el número de fibras, Nygaard (1982) piensa que este incremento en el número de fibras, es el resultado del crecimiento longitudinal de éstas, que al interponerse unas entre otras, ofrecen un aspecto de mayor número en el corte transversal. Este mismo planteamiento es apoyado por Rosser y cols (1995), que valoran el tipo de miosina en función del área de corte, viendo que cuando el número de células aumenta aparentemente, las de diámetro más pequeño expresan miosinas jóvenes, con MHCneo, mientras que esta isoforma no aparece en las de mayor diámetro, con lo que concluyen que estas nuevas fibras delgadas, solo son los extremos en crecimiento de las ya existentes.

Ya hemos descrito en apartados anteriores (2.2.2. y 4.1) la disposición exacta de las miofibrillas dentro de la sarcómera, para que la contracción sea óptima. En el caso del ejercicio constante, los filamentos periféricos de actina, ejercen una fuerza oblicua durante la contracción, que tira del disco Z, donde todos se unen, produciendo un desajuste en el retículo, con cada acortamiento durante la contracción. Cuando esta fuerza oblicua desarrollada es constante y muy rápida, como la que se produce durante los entrenamientos, llegan a romperse los discos Z en algunos puntos. Si se produce en toda la longitud de la miofibrilla, se separan dando lugar a nuevos elementos.

Shear y Goldspink (1971), comprobaron que en las fibras de contracción rápida, las miofibrillas presentan lugares de ruptura en toda la longitud, mostrando un punteado continuo y discreto, mientras que en las fibras de contracción lenta, aparecen las miofibrillas bifurcadas, presumiblemente por roturas incompletas. Posteriormente, Gibala y cols. (1995) demostraron con microscopía electrónica, la presencia de células con miofibrillas interrumpidas, en biopsias obtenidas al inicio de programas de entrenamiento, tanto en deportistas de resistencia como de velocidad. Para Tamaki y cols. (1997), este aumento de miofibrillas, está siempre precedido de un daño tisular a este mismo nivel, con rupturas múltiples, dependiendo de la intensidad del ejercicio, que serían fundamentales para inducir la regeneración, con formación de nuevos elementos. Por otro lado, esta rotura transversal, expone nuevos lugares para polimerización de monómeros de actina y miosina, que permite completar el crecimiento de estas nuevas

miofibrillas, así como colaborar al desarrollo extensivo del RS, del sistema de túbulos T y el aumento del número de mitocondrias, lo que en conjunto favorece el metabolismo muscular y su incremento en superficie de corte transversal.

Durante el desarrollo postnatal, se pueden apreciar ejemplos palpables de este proceso en músculos como el bíceps braquial, recto abdominal y gastrocnemio estudiados por Aherne y cols. (1971) en 22 hombres, viendo como sus fibras aumentan desde $36,5\text{-}48,2\ \mu\text{m}^2$ a las 37 semanas, hasta $2.000\ \mu\text{m}^2$ a los 18 años. Estudios más amplios de Colling-Saltin (1980), aportan datos del desarrollo de la porción lateral del cuádriceps, rectos del abdomen, deltoides, bíceps braquial, soleo y gastrocnemio en 86 fetos y 50 niños de 7 años, con unas medidas de $36,3\ \mu\text{m}^2$ a las 12 semanas, $128\ \mu\text{m}^2$ a las 21 semanas, $200\ \mu\text{m}^2$ a las 42 semanas y $500\text{-}600\ \mu\text{m}^2$ al año. Brooke y Engel (1969) obtienen medidas en diferentes músculos del adulto, que oscilan entre 2.500 a $10.000\ \mu\text{m}^2$.

Sabemos que los cambios en el tipo de fibra y en la morfología del músculo, dependen de cuál va a ser su destino y su función. Este es un hecho comprobado por numerosos autores y entre ellos, Narici y cols. (1996), que demostraron cómo tras un programa experimental de entrenamiento asimétrico en ambas piernas, el incremento de área transversal en el cuádriceps, aumenta en un $18,8\pm 7,2\%$ en la región distal, un $19,3\pm 6,7\%$ en la proximal y un $13,0\pm 7,2\%$ en la zona media, mientras que en el vasto lateral, el aumento no es significativamente diferente en función de la localización.

Con el tipo de deporte varía el tipo de fibra que incrementa su superficie de corte. Mero y cols (1991) estudian grupos de niños de 11 a 13 años, a los que se somete a diferentes programas de entrenamiento para fuerza y resistencia, viendo que el aumento del área de las fibras es directamente proporcional a la edad y peso, a la cantidad de fuerza que son capaces de desarrollar para igual tiempo de entrenamiento, y a la concentración de testosterona y lactato sérico. El tiempo que llevan practicando el ejercicio, parece un elemento importante en las diferencias que se producen en el área de las fibras.

Datos referidos al desarrollo mediante el ejercicio, muestran cómo un levantador de pesas, generalmente presenta fibras con mayor superficie que un individuo sedentario o que aquellos que ejercen actividades sedentarias (Edström y Ekblom, 1972; Costill y cols., 1979). A las 8 semanas de entrenamiento, la masa total del músculo ha aumentado en un $2,5\%$ con predominio de las fibras de contracción rápida (FT) (McDougall y cols., 1979). La diferencia de la superficie transversa de las fibras entre hombres y mujeres dedicados al culturismo, fue estudiada por Alway y cols. (1989) viendo que el área media de corte fibrilar era de $9607\ \mu\text{m}^2$ en hombres y $5386\ \mu\text{m}^2$ en mujeres. Atendiendo al tipo de fibra, las tipo II eran 1,6 veces mayores en hombres que en mujeres, mientras que las tipo I presentaban una superficie similar. Bell y Jacobs

(1990) comparan el área fibrilar entre hombres y mujeres culturistas y con los grupos control respectivos. Para las fibras FTa, los culturistas tienen áreas mayores que los controles y los hombres bastante mayores que las mujeres. El análisis de ST muestra que en los culturistas tienen mayor superficie que en los controles. Entre el grupo de mujeres entrenadas, la superficie de ST y FT fue similar, pero entre los hombres FT era mayor que ST.

Las variaciones que aparecen en un grupo de hombres sanos con un programa de entrenamiento intensivo para velocidad, fue propuesto por Aitken y cols. (1989), viendo que la superficie de corte, todas sufren un incremento de $318 \pm 215 \mu\text{m}^2$ para las fibras tipo I, $625 \pm 207 \mu\text{m}^2$ las IIa y $773 \pm 196 \mu\text{m}^2$ las IIb.

Mientras tanto, en los atletas de resistencia, la hipertrofia fibrilar a los 6 meses es menor y con claro predominio de las fibras de contracción lenta (ST) (Gollnick y cols., 1972). Glenmark (1994) valora la diferencia de superficie de corte transversal y los tipos de fibras predominantes en deportistas de resistencia, hombres y mujeres, desde los 16 a los 27 años y demuestra que en ambos sexos aumentan en número las fibras tipo I, pero no en diámetro, con respecto al grupo control, pero es mayor en hombres en ambas edades.

En cuanto a la variación en el área de corte transversal de las fibras musculares en los atletas de resistencia aumentan en ambos tipos, pero durante los dos primeros meses lo hacen las fibras FT y entre los 2 y 6 meses el fenómeno aparece en ST. En sprinters masculinos, el área de las fibras FT era mayor que en el grupo control, pero en las mujeres no variaba (Abernethy y cols. 1990). En el entrenamiento intensivo para canoistas, Baker y Hardy (1989) observan que la superficie de las fibras tipo I no se altera significativamente, mientras que las tipo II aumentan hasta un 82% de la superficie desde el inicio del entrenamiento. Kuzon y cols. (1990) no encuentran diferencias significativas en el diámetro fibrilar entre futbolistas y controles, aunque todos los tipos tienden a ser algo mayores en los deportistas. Lo mismo sucede en los trabajos de Wang y cols (1993) y Andersen y cols (1994), que demuestran un ligero aumento en la superficie respecto a los grupos control, siendo además similar en todos los tipos de fibras.

Por otro lado, la inactividad durante 5 semanas provoca una disminución en el diámetro del 27% de las fibras ST y a las 15 semanas, la disminución de diámetros es del 47% para ST y del 38% para FT (Häggmark y Thorstensson, 1979) recuperando la normalidad al volver a realizar el ejercicio propuesto.

En el extremo opuesto, Iwaoka y cols. (1989) estudiaron la superficie de corte transversal en el músculo vasto lateral en campeones de salto, a los 71 años, en los que encuentra unas dimensiones de $34,3 \mu\text{m}^2$ en las fibras tipo I, $33,2 \mu\text{m}^2$ en las IIa y $23,4$

μm^2 para las IIb. A pesar de estas áreas pequeñas, se mantenían por encima de los sujetos con vida sedentaria y la cantidad de fuerza generada, estaba por encima de lo previsto para su tamaño. Lexell y cols (1995) plantean un estudio similar en mujeres y hombres de 70 a 77 años, que han mantenido un ejercicio de resistencia durante toda su vida, comprobando un significativo incremento de área en todos los tipos de fibras en el bíceps braquial, y más alto para las tipo II en el vasto lateral. Estudios similares fueron llevados a cabo por Taaffe y cols, (1997) y Sipila y cols, (1997).

5.1.3.- Variaciones en el retículo sarcoplásmico y sistema T.

El aumento de cisternas del RS y la extensión del sistema de túbulos T se presenta en paralelo al aumento de miofibrillas en cada célula. Ya vimos que la rotura en el espesor de las miofibrillas, a nivel de los discos Z, proporciona la posibilidad de independización de nuevos elementos miofibrilares, que crecen longitudinalmente por fijación de nuevas sarcómeras en serie, dando un aumento en el área de corte transversal de la célula (Shear y Goldspink, 1971). Alrededor de ellas se va extendiendo el RS, de forma que la velocidad de ceder o secuestrar Ca^{2+} se mantenga constante en todas las miofibrillas, tanto en estas fibras ST como en las FT (Shafiq y cols, 1981), aunque en las tipo I los túbulos T aparecen en menor cantidad que en las tipo II (Sato y cols., 1986).

Las proteínas del RS implicadas en el transporte de Ca^{2+} (Ca-ATPasa y Ca-secuestrina) van disminuyendo al avanzar la edad, pero en atletas que han mantenido su actividad a lo largo de toda su vida, esta disminución no se produce (Klitgaard y cols., 1989). También se sabe que la capacidad de acumular Ca^{2+} es de 4 a 11 veces mayor en las fibras FT que en las ST, aunque en éstas últimas existen otras proteínas fijadoras de calcio (Dulhunty y cols., 1987), por lo que no es un elemento diferenciador exacto. Maguire y cols. (1997) han estudiado cómo varía el proceso de oligomerización de la calsecuestrina en la fijación de Ca^{2+} , cuando se estimula el músculo con una corriente de baja frecuencia, sin observar cambios importantes en la función fijadora, al modificarse el tipo de fibras predominantes, de rápidas a lentas. Desde este punto de vista metabólico, Viru (1994) valora entre otros, la acumulación de Ca^{2+} y glucógeno en el RS, viendo cómo es mayor en los sprinters, seguidos de los corredores aerobios de medias distancias, los entrenados para fuerza y por último los nadadores.

Alway y cols (1989) analizaron la ultraestructura y las propiedades contráctiles en una población de levantadores de peso, antes y después de entrenamiento isométrico unilateral al 100% de contracción rápida. Para ellos, la densidad del volumen de la malla del RS y de los túbulos T en el músculo gastrocnemio, aumentan en un $3,2 \pm 0,6\%$ en las fibras tipo I y $5,9 \pm 0,9\%$ en el tipo II, después del entrenamiento. En el soleo, la fracción incrementada de volumen de RS llega hasta un $3,5 \pm 1,2\%$ en las fibras tipo I, sin embargo, la correlación no fue significativa entre el cambio en la densidad de

volumen del RS y el cambio en el tiempo de velocidad de contracción. La densidad del RS también ha sido estudiada por Sukhova y cols. (1991), comparando un grupo de sprinters con otro de atletas de deportes variados, en muestras obtenidas por biopsia del vasto lateral, viendo que el incremento es mucho mayor que en el caso de Alway y cols. (1989), con valores de un 28,5% en el primer grupo y un 36% en el segundo.

5.1.4.- Variaciones en la dotación mitocondrial.

Las variaciones en el número, tamaño y localización de las mitocondrias, según el tipo de fibra muscular, ya han sido descritas en el apartado 3.4.2. La relación volumen de las mitocondrias/volumen de las fibras, varía notablemente de un músculo a otro. En varias especies de animales, en los músculos utilizados para la locomoción, esta relación oscila entre un 2 y un 6%, mientras que en el diafragma alcanza del 10 al 12%. En el músculo esquelético humano de tipo mixto, como por ejemplo el vasto lateral, la relación volumen mitocondria /volumen de fibras, es de alrededor del 5% en sujetos no entrenados (Prampetro, 1990). Durante el entrenamiento para el ejercicio, se fuerza al músculo para aumentar su metabolismo, por tanto, los elementos citoplásmicos directamente implicados en él, como son las mitocondrias, sufrirán variaciones morfológicas y bioquímicas. El aumento del rendimiento de la fibra viene dado por la conjunción de ambos parámetros.

Los datos de que disponemos en la actualidad, son contradictorios en algunos puntos. McDougall y cols. (1979) plantean que la importante proliferación de las proteínas contráctiles que se instaura tras largo tiempo de práctica del deporte, da como resultado una dilución en la concentración de mitocondrias en la fibra muscular. Sin embargo, estas mitocondrias experimentan variaciones en su volumen como lo demuestran Jansson y Kaijser (1977) y Bylund-Fellenius (1977), para los que en condiciones físicas de entrenamiento regular, existe un incremento significativo del tamaño de las mitocondrias en las fibras FT, que llegan a ser 4 veces mayores que en el individuo sedentario, mientras que las mitocondrias de las fibras ST, sólo sobrepasan a éstos en 2,5 veces. Wang y cols (1993) estudiaron las variaciones del tamaño mitocondrial en el músculo vasto lateral, después de 18 semanas de entrenamiento para resistencia, encontrando un incremento del volumen mitocondrial absoluto con el entrenamiento, para la mayoría de los tipos de fibras, algo mayor en las de tipo I y IIa. Estos aumentos siempre eran proporcionales al del tamaño de la fibra.

Kayar y cols. (1986), plantean el mismo protocolo en atletismo, estudiando los cambios producidos por determinados ejercicios, no encontrando diferencias entre el tamaño de las mitocondrias de diversa localización dentro de cada fibra muscular, pero sí entre los atletas de resistencia, con un aumento en volumen y densidad de más del 50% con respecto al grupo control. Ingjer (1979 a y b), estudia las mismas variaciones en diferentes tipos de fibras en hombres y mujeres y en entrenamiento para resistencia.

El contenido mitocondrial fue determinado semicuantitativamente, utilizando el número de agregados subsarcolémicos presentes. El tamaño y acumulación de estas agrupaciones, variaba en gran extensión dentro de la fibra muscular, pero no describió diferencias con grupos control ni con entrenamiento para fuerza.

Estos datos pueden correlacionarse con los estudios de Hoppeler y cols. (1983 y 1985) en los que muestran cómo después del entrenamiento para resistencia, aparece en diferentes músculos de rata, un aumento de volumen y densidad mitocondrial, relativamente mayor en la zona subsarcolémica de la fibra, que en la interfibrilar. Sukhova y cols. (1991) determinan la densidad de volumen mitocondrial viendo que en sprinters aumenta en un 7,6% y en deportistas de resistencia de un 9,2%, en el vasto lateral. Howald y cols (1985) llevan a cabo un protocolo experimental de entrenamiento para resistencia en sujetos sedentarios, valorando resultados a las 6 semanas y a los 6 meses, demostrando cómo la densidad mitocondrial en cuanto a su volumen, aumenta en todos los tipos de fibras: a las 6 semanas las tipo I en un 35%, las IIa un 55% y las IIb un 52%, con distribución preferentemente interfibrilar para la primera y subsarcolémica en las dos segundas. A los 6 meses, la densidad del volumen mitocondrial sigue aumentando, pero en mayor proporción para las IIb, seguidas por las tipo I y IIa.

Morfológicamente, Ferretti y cols. (1997) estudian la densidad mitocondrial en muestras de biopsia del vasto lateral en deportistas, antes y después de 42 días de reposo total, y determinan que su densidad se ha reducido en un 16,6%. El volumen mitocondrial total también se ve afectado, con un descenso de 28,5% al final de la inmovilización.

La actividad mitocondrial se afecta en su totalidad y no sólo en lo referente al trabajo de sus enzimas, que veremos en el siguiente apartado. Recientemente Neuffer y cols (1996) han estudiado el momento en el que se desencadena la síntesis proteica para adaptación al ejercicio y de qué forma están compartimentalizadas las proteínas nacientes, en las etapas de inicio de la estimulación muscular con contracción continuada, valorando también en su protocolo, la expresión de proteínas que dependen de ADN mitocondrial y obtienen resultados de RNAm para las proteínas de shock térmico (HSP60) mitocondrial, con un incremento superior a más de 18 veces el primero y más de 5 veces para la proteína después de 21 días de ejercicio.

5.1.5.- Variaciones en la capacidad metabólica de la fibra muscular.

Las variaciones metabólicas con el ejercicio se plantearon a principios de los años 70, estudiándose en el hombre entrenado para resistencia y para desarrollar fuerza (Gollnick y cols., 1972). En ambos casos, se determinaron las variaciones en la capacidad para consumir O_2 , medidas por el nivel de actividad del ciclo del ácido cítrico y el sistema de transporte de electrones, viendo cómo la actividad de la citocromo

oxidasa y la SDH se encontraban elevados en los atletas de resistencia (McDougall y cols., 1979), mientras que el ejercicio destinado a desarrollar fuerza no alteraba la actividad de los enzimas mitocondriales (Costill y cols., 1979). Los estudios de Oscai y Holloszy (1971) muestran que otra parte de las enzimas mitocondriales no varían con el ejercicio, ni en su actividad ni en su concentración, como la CK, aldehído quinasa, α -GPDH, etc. Gollnick y su equipo continuaron avanzando en este planteamiento y demostraron que la adaptación más llamativa sigue siendo el incremento en la concentración de mitocondrias y de las enzimas para metabolismo oxidativo, durante el entrenamiento. Este incremento del potencial oxidativo aparece tanto en las fibras de alto consumo de O_2 (SO) como en las de bajo consumo (FG). El grado de adaptación del músculo, depende del tipo y duración del ejercicio. El cambio más llamativo es con el entrenamiento prolongado para resistencia y solo aparecen pequeñas variaciones con el enfrenamiento para velocidad. El incremento de potencial oxidativo aumenta su capacidad aerobia para utilizar su energía de reserva, en cuanto a depósitos intracelulares como aportados por vía sanguínea, tanto los dependientes de glucógeno, como el de ácidos grasos.

Sin embargo, al estudiar diferentes músculos de un mismo deportista (Gollnick y cols., 1972), habían visto que la respuesta adaptativa en la actividad enzimática tiene una naturaleza local. En ciclistas y corredores, la comparación de estos parámetros entre brazos y piernas, presenta niveles de actividad mucho mayor en las piernas, así como en los canoistas, la actividad enzimática de las mitocondrias de los músculos de las piernas, superaba ampliamente a la de los brazos.

Los sprinters y los deportistas entrenados para desarrollar fuerzas isométricas, fueron estudiados por Saltin y cols. (1976) y Baldwin y cols. (1973) respectivamente, llegando a la conclusión de que ambos grupos presentan una respuesta adaptativa, con un aumento significativo de enzimas mitocondriales, apoyando el hecho de que la concentración de estas enzimas aumenta en demanda a un alto consumo de O_2 por el músculo. Teniendo en cuenta el tipo de fibra muscular, con tinciones con NADH-nitrotetrazolium-reductasa o SDH, el aumento de enzimas oxidativos aparece en todas ellas. Aitken y cols. (1989) estudiaron la relación VCO_2/VO_2 después de un ejercicio incrementado al máximo, viendo que era mayor después del entrenamiento, sin variar VO_2 ni VO_{2max} .

Los estudios de Ingjer (1979a y b), iban también encaminados a caracterizar las fibras tipo IIab, concluyendo que el contenido mitocondrial y su capacidad metabólica, era intermedio para los valores obtenidos entre IIa y IIb, hecho que para Staron y cols. (1983) y Green y cols (1983), concuerda plenamente con la variación de la capacidad oxidativa de este tipo de fibras. Para Cogswell y cols (1993) las variaciones que aparecen en las enzimas mitocondriales, no dependen sólo del ejercicio, sino también de su localización en la célula, según sean intermiofibrilares o subsarcolémicas. Para

ellos, la citocromo oxidasa aumenta un 20% más en las intermiofibrilares y la SDH un 40% en las subsarcolémicas. Estas variaciones representan poblaciones mitocondriales en diferentes estadios biogénicos.

Wang y cols. (1993) en el mismo protocolo anteriormente comentado, obtienen un aumento de la citocromo oxidasa y hexoquinasa en todas las fibras, con el entrenamiento, pero la CK, citratosintetasa, PFK, gliceraldehido fosfato hidrogenasa y la hidroxiacetil CoA, no varían. El resultado sugiere que este tipo de entrenamiento para resistencia, produce un incremento en la capacidad de fosforilación oxidativa en conjunción con la disminución en el porcentaje de fibras tipo IIb.

Análogamente, durante el desentrenamiento o la inmovilización forzada, la caída de la actividad enzimática es mucho más rápida que la del máximo consumo de O_2 por ejemplo, después de casi cuatro semanas del final del entrenamiento, las enzimas mitocondriales han alcanzado los valores del periodo previo al entrenamiento, mientras que el máximo consumo de O_2 se mantiene todavía hasta un 12% más elevado que en individuos sedentarios (Prampero, 1990). Igualmente Ferretti y cols., (1997), tras 42 días de inmovilización, detectan un descenso en la capacidad oxidativa de un 11% en el vasto lateral de deportistas.

El crecimiento y diferenciación de las fibras musculares necesita la síntesis preferencial de proteínas miofibrilares, citoplásmicas o mitocondriales, que serán diferentes según el tipo de fibra considerado. Entre estos productos, Eriksson y Myrhaage (1972) estudió en adolescentes y Karlsson y cols. (1972) en adultos, el incremento de ATP y creatinín fosfato (CP) en los músculos de extremidades, con un programa de entrenamiento para resistencia. Después de 3 a 6 meses, la diferencia de concentración de ATP y CP era considerable respecto al grupo control. Según el tipo de fibra, su concentración es ligeramente mayor en la ST que en las FT, en los músculos de atletas masculinos de competición de resistencia (Härkönen y cols, 1980). Estos datos fueron ampliados por Tesch y cols. (1989) que estudiaron contenido de CP en el vasto lateral, antes, inmediatamente después y a los 60 minutos de terminar el ejercicio. Las concentraciones en reposo fueron de $82,7 \pm 11,2$ mmol/Kgr en las fibras FT y $73,1 \pm 9,5$ mmol/Kgr en las ST. Después del ejercicio los valores disminuyeron a $25,4 \pm 19,8$ y $29,7 \pm 14,4$ mmol/Kgr respectivamente para empezar a recuperar la concentración y llegar a los 60 minutos a $41,3 \pm 12,6$ y $49,6 \pm 11,7$ mmol/Kgr. En el mismo protocolo determinan que el ATP disminuye en todas las fibras y el lactato llega a $67,4 \pm 28,3$ mmol/Kgr después del ejercicio. La diferencia a favor de mayores concentraciones de CP en la fibras FT proporcionan un medio de valorar la diferencia metabólica (Bangsbo y cols. 1992).

Son poco conocidos los efectos del entrenamiento sobre la actividad de los enzimas glucolíticos en el hombre. Las reservas de glucógeno aumentan en hombres

entrenados para cualquier deporte, en comparación con el grupo control sedentario (Hermansen y cols., 1967; Gollnick y cols., 1972; McDougall y cols., 1979). El enfrenamiento para fuerza-velocidad no provoca ninguna variación significativa en las enzimas clave de la glicolisis. Sin embargo, cuando se reduce la intensidad del entrenamiento y se aumenta el tiempo, se observa un incremento de alrededor del 20% de la actividad de las fosforilasas y PFK (Green y cols. 1987; Prampero 1990).

Piehl y cols. (1974) y Saltin y cols., (1976) estudiaron la concentración de glucógeno en deportistas que entrenaban de manera asimétrica las extremidades contralaterales, resultando de sus estudios que esta concentración es de 6 a 60 mmol/Kgr de diferencia entre los músculos de la pierna entrenada con la no entrenada. En ciclistas, canoistas y nadadores, la diferencia entre brazos y piernas es de 20 a 101 mmol/Kgr mayores en brazos que en piernas.

El entrenamiento de resistencia conduce a un incremento del depósito intramuscular de glucógeno en todas las fibras, por aumento de la glucógeno sintetasa, mientras que el ejercicio de velocidad, incrementa el depósito de glucógeno de forma similar en cantidad, pero lo hace a expensas de reducir su utilización en el ejercicio moderado, consiguiendo que la deplección tarde más en producirse cuando el ejercicio es intenso (Abernethy y cols., 1990).

Essen y Henrikson (1974), determinaron una cantidad similar en el contenido de ambos tipos de fibras, ST y FT y en ambos disminuye después del ejercicio. El total de glucógeno utilizado en el ejercicio (hasta un 80-95% del depósito según Karlsson y cols., 1971), varía dependiendo del tipo de ejercicio, dinámico o isométrico, intermitente o constante (Gollnick y cols., 1972). Utilizando estimulación eléctrica, Sinacore y cols (1990) valoraron el grado de actividad de las fibras musculares, determinando la deplección de glucógeno. Todas las fibras dan reacción PAS+ de manera uniforme antes de la estimulación, pero después, la tinción disminuye mucho más en las fibras tipo II, llegando en algunos casos a la deplección de glucógeno casi total. Según Abernethy y cols. (1990), la deplección por ejercicio prolongado aparece en diferente orden de fibras, según el ejercicio realizado. En los deportes de resistencia, primero se elimina de las fibras ST para seguir las FTa y las FTb, mientras que en el ejercicio para velocidad o fuerza, la deplección aparece primero en FTb, FTa y por último en ST.

La actividad de la síntesis de glucógeno aumenta con el entrenamiento, así como la actividad de las enzimas implicadas, como la hexoquinasa, glucógeno sintetasa, etc. (Taylor y cols, 1972; Piehl y cols, 1974; Burke y cols., 1977 y Houston, 1978). Después del ejercicio prolongado, hay una resíntesis de glucógeno más lenta en las fibras tipo I que en las tipo II (Vilestad y cols., 1989). Las variaciones de los mecanismos glicolíticos han sido menos estudiados en cuanto al desarrollo durante el ejercicio de fuerza o resistencia y menos aun considerando las variables para cada área. En condiciones de

máximo esfuerzo, Landin y cols (1974) no han encontrado variación en la concentración y la actividad de PHOS, PFK y LDH, tanto en ejercicio dinámico como estático, pero sí parece estar en relación con la duración total del ejercicio. Al aumentar el tiempo de entrenamiento de 6 a 30 semanas, se observa un aumento del 10-20% en PHOS, hexoquinasa y PFK (Morgan y cols., 1971), manteniendo los niveles de LDH.

Las actividades de PHOS, PFK y PK no varían en el ejercicio en las fibras FT, mientras que en las ST tienen un 70% más de actividad para la PHOS y un 35% para la PK en el músculo soleo (Saubert y cols., 1973). Después de media hora de entrenamiento diario durante unos pocos días, el aumento de PFK es manifiesto en todas estas fibras, mientras que la inmovilización lo vuelve a valores normales (Illg y Pette, 1979; Viru, 1994). Para Santana-Pereira y cols. (1996) el contenido de PK fue menor en las fibras tipo I que en las tipo II, después de un periodo de entrenamiento para velocidad, mientras que Sahlin y cols (1997) con programas similares, apuntan que las fibras tipo II vacían antes que las I sus depósitos de glucógeno, en los límites de la fatiga.

La LDH es diferente en composición y localización celular dependiendo del tipo de fibra y puede ser un importante factor en la función fibrilar (Gollnick y cols., 1972; Karlsson y cols., 1974; Peter y cols., 1971). Así vemos cómo en los sprinters entrenados aparece LDH4-5 en mayor cantidad que en los deportistas de resistencia, en los que aparece una LDH1-2 (Sjodin, 1976). Esta molécula disminuye en soleo y porción blanca del gastrocnemio, después de 16 semanas de entrenamiento para resistencia.

Para Kiens y Lithell (1989) el entrenamiento lleva al organismo a una regulación y adaptación del metabolismo lipoprotéico. Ellos utilizaron un grupo de hombres sanos con entrenamiento para ejercicio dinámico en una pierna, utilizando la otra como control y tomando muestras de los músculos extensores. De sus resultados se desprende que la actividad de la lipoproteína-lipasa en ejercicio presenta concentraciones mayores que en reposo ($70 \pm 29\%$) y sus valores no vuelven a la normalidad hasta 2 h después de terminar el ejercicio. También el VLDL-triglicérido (VLDL-TG) aumenta desde 30 $\mu\text{mol/l}$ en el control, hasta 55 $\mu\text{mol/l}$ con el ejercicio. Estos dos parámetros elevados contribuyen a una alta producción de HDL colesterol (HDL2-C) con valores de concentración de 88 $\mu\text{mol/min}$, manteniéndose más alto a nivel venoso que arterial, durante el ejercicio. Puzo y cols. (1989) también encuentran valores significativamente más altos de ácidos grasos libres en el grupo control y en los deportistas de velocidad, en relación con los de resistencia que a su vez presentan un HDL-C más alto. Según Abernethy y cols. (1990) el entrenamiento para resistencia, incrementa los depósitos de triglicéridos próximos a las mitocondrias, en mayor cantidad en las fibras ST que en las FT. Los TG endógenos, pueden suponer hasta un 50% del total de lípidos oxidados durante el ejercicio.

La PGM disminuye en todos los músculos con la actividad, con cambios muy pequeños pero con significación estadística (Hickson y cols., 1975). En esta misma línea, Cannon y cols. (1989) estudiaron el aumento en sangre de la concentración de IL-1 β , después del ejercicio, viendo que se mantiene en músculo hasta después de 5 días. Esta inmunoreactividad no se ha visto en individuos sedentarios. La IL-1 α (TNF) se detecta en menor cantidad en las mismas condiciones, por lo que la inducción de proteólisis disminuye en los días siguientes al ejercicio.

Las variaciones en la concentración de iones, van unidas a las que soporta el glucógeno (Macchi, 1991), y así vemos que en el ejercicio prolongado, que además se acompaña de pérdida de electrolitos por el sudor, el K⁺ disminuye en mayor o menor proporción, paralelamente a la del glucógeno, mientras que el Mg²⁺ solo se ve afectado en escasa proporción (Ahlbrg y cols., 1967). El Na⁺ intracelular aumenta en estas condiciones en respuesta a la acidosis (Bergström y cols., 1973). Sjogaard (1986) estudia estas variaciones y concluye que durante la contracción isométrica de baja intensidad, el flujo de sangre se mantiene relativamente alto, para aportar el suplemento de sustrato muscular (O₂ y glucosa) y prevenir la deplección del sustrato intramuscular. El mismo autor en 1988, en un trabajo orientado a prevenir la fatiga muscular, determina la disminución de K⁺ dependiendo de la intensidad de la contracción y la restauración a niveles normales, se consigue de 10 minutos a 1h después de terminar el ejercicio. Para este autor, el incremento de Na⁺ intracelular, es mínimo, compensado con los movimientos de agua intra y extracelular.

Una salida de K⁺ significativa desde el espacio intracelular, inducida por el ejercicio mantenido, puede llevar a una disminución de la contractilidad muscular, por disminución del potencial de membrana, pero el entrenamiento aumenta el número de bombas de Na-K en la membrana (Klitgaard y Clausen, 1989), para compensar que la disminución intracelular de K⁺ lleve a una acumulación de Ca²⁺ y disminución del ATP que llevarían a la destrucción de la célula. La concentración de bombas de Na-K fue determinada por Kjeldsen y cols. (1990) en el músculo vasto lateral, después del ejercicio moderado, viendo que apenas variaba (de 308 $\pm$ 13 pmol/gr antes, a 300 $\pm$ 7 pmol/gr después del ejercicio), pero con el ejercicio intenso e, número de bombas puede reducirse, variando la concentración de K⁺ plasmático (Sjogaard y McComas, 1995).

Los datos obtenidos por denervación, que aclararían qué tipo de control se ejerce sobre estas variaciones enzimáticas y metabólicas, son altamente contradictorios y son necesarias nuevas investigaciones para esclarecerlos.

5.2.- CRECIMIENTO DEL TEJIDO CONECTIVO MUSCULAR.

Son limitados los datos de que disponemos, en cuanto al estudio de las variaciones del tejido conjuntivo en el músculo sometido al ejercicio y sus diferencias,

si tenemos en cuenta el tipo y proporción de fibras musculares que componen cada músculo y el tipo de ejercicio a que se ve sometido. El incremento total en la cantidad de ADN en las fibras de atletas, afecta en gran parte al localizado en el tejido conjuntivo del músculo estriado esquelético (Fleckman y cols., 1978), por lo que habrá que considerar sus modificaciones al estudiar el aumento de tamaño del músculo con el ejercicio, sin olvidar incluir en este apartado las variaciones que sufre el árbol vascular que discurre por él.

5.2.1.- Variaciones en las vainas musculares.

Los primeros datos aportados en relación al aumento de tejido conjuntivo en el músculo, en relación al ejercicio, se los debemos a Häkkinen y cols. (1973), al estudiar el incremento de actividad de enzimas del metabolismo energético en el endomisio. Turto y cols. (1974) con inducción del trabajo en el músculo plantar de la rata y en el tendón del músculo gastrocnemio, consiguen valorar el incremento en la actividad de la enzima protocógeno-prolina-hidrolasa. En el entrenamiento para resistencia en ratones corredores, también se ha encontrado una estimulación de síntesis de tejido conectivo y tendones (Suominen y cols., 1980).

Teniendo en cuenta que la relación con los diferentes tipos de fibras puede variar el conectivo más próximo, Kovanen y cols (1980) detectaron un aumento de contenido de colágeno en las fibras ST en comparación con el colágeno de las FT que no varía. El estudio fue hecho en diferentes músculos de pollo y rata, con el entrenamiento para fuerza, induciendo hipertrofia.

En humanos, Suominen y cols. (1980) concluyen que tras 8 semanas de programa de entrenamiento, se incrementa la actividad de la propil-hidroxilasa en el conjuntivo del músculo vasto lateral de mujeres y detectan en hombres de 33 a 70 años, una alta actividad de la misma enzima en el mismo músculo, en aquellos que se han mantenido habitualmente activos, en comparación con los sedentarios.

El aumento en la proporción de colágeno, también fue detectado por Williams y cols. (1988) al estudiar el proceso de inmovilización. Este aumento se presenta pocos días después de la inmovilización y antes de que aparezca una disminución en el número de sarcómeros en serie. De esta manera confirman los datos anteriores de Williams y Goldspinck (1984), en los que este hecho solo se presentaba cuando el músculo era inmovilizado en posición de acortamiento. Esto mismo se puede constatar cuando disminuye el ejercicio de una pierna con respecto a la otra, pero no aumenta si la inmovilización se produce en extensión o cuando se combina con estimulación eléctrica.

Como vemos, son pocos los datos aportados y hacen falta nuevos estudios bioquímicos y morfológicos para determinar la diferencia del incremento que se produce con el ejercicio o en la inmovilización. En este sentido, Sakuma y cols., (1993) han estudiado morfológicamente las diferencias en la población de fibroblastos en ligamentos y fascias de músculos de ratas entrenadas para correr, viendo como en el grupo control, estas células presentan forma ovoidea y núcleo redondo, mientras que con el ejercicio los fibroblastos aparecen alargados y sus núcleos presentan escotaduras, además de aparecer un aumento en el retículo endoplásmico rugoso y en el número de vesículas lisosómicas. El diámetro de las fibras de colágeno varía entre 20 y 120 nm con el ejercicio, mientras que era de 50 a 80 nm en el grupo control. El diámetro medio de las fibrillas de colágeno fue de $70,8 \pm 16,6$ nm en reposo y $66,6 \pm 21,9$ nm con ejercicio.

5.2.2.- Variaciones en los capilares de la fibra muscular.

Sillau y Banchemo (1978) estudiaron el comportamiento de la vascularización muscular durante el crecimiento y desarrollo, viendo que cuando la fibra muscular aumenta en longitud y diámetro, también lo hace en valor absoluto, el número de capilares que la rodean, pero la densidad de capilares por unidad de área disminuye. Este aumento en el número de capilares por fibra varía según la especie y el músculo considerado. Hudlická (1980) determinó que los animales pequeños tienen una cantidad de capilares proporcionalmente mayor que las grandes especies.

Para Boreham y cols., (1988) hay una clara relación inversa entre el tamaño del músculo y la densidad capilar. Con la rápida reducción en esta densidad que impone el crecimiento, deben existir mecanismos compensatorios que mantengan una adecuada difusión celular. La mayor o menor superficie transversa de la fibra, puede aumentar o disminuir la distancia de difusión al centro de la célula, pero su concentración en pigmentos respiratorios contribuye a mantener el transporte adecuado de O_2 dentro de la célula (Aquin y cols., 1980).

Las marcadas diferencias en los índices de capilaridad entre el músculo rápido EDL y el sóleo lento, desaparecen cuando estos índices se relacionan con el tamaño de la fibra muscular, igual que sucede en la correlación entre la capacidad oxidativa del músculo y su capilaridad (Hoppeler y cols., 1983). En músculos no entrenados, las fibras FTb tienen una gran área de fibra por capilar y una baja capacidad oxidativa, pero la adaptación al desarrollo de fuerza que produce el uso de estas fibras, lleva a un aumento en el número de capilares, aunque la relación se mantiene constante. Los capilares empiezan a desarrollarse antes de que se detecten variaciones en los enzimas oxidativos (Boreham y cols., 1988). Por otra parte, pueden formarse nuevos capilares para mantener la relación capilar/fibra constante. Esta angiogénesis puede iniciarse por señales químicas debidas a la acumulación intracelular de metabolitos, asociados a la

hipoxia en el aumento de actividad durante el ejercicio, o resultar de factores mecánicos dependientes del flujo sanguíneo intracapilar (Hudlickä, 1984; Fuglevand y Segal, 1997).

Mizumo y Secher (1989) han comparado la vascularización entre los músculos respiratorios y el vasto lateral, en biopsias de hombres sanos sedentarios, determinando que el número de capilares/fibra fue más alto en espiradores internos ($2,3 \pm 0,1$), que en inspiradores internos y externos ($1,6 \pm 0,1$) y que en vasto lateral ($1,8 \pm 0,2$). Es decir, las fibras FTa que predominan en el primer músculo estudiado, presentan mayor capilaridad, dependiendo más de su trabajo que de su anatomía.

El planteamiento en atletas fue llevado a cabo por varios autores (Jennekens y cols., 1971; Andersen y Henriksson, 1977; Ingjer, 1978; Nygaard, 1982), utilizando técnicas de histoquímica y microscopía electrónica, en músculos humanos sedentarios y adaptados al ejercicio. Detectaron igualmente un incremento en el número de capilares por fibra y una disminución en el número de capilares por mm^2 . Este aumento de capilaridad en los músculos entrenados, va paralelo al aumento en la capacidad máxima del volumen de oxígeno, hecho en el que insisten Poole y Mathieu (1996), que mantienen que la superficie capilar por superficie de fibra puede estar en relación con las variaciones del volumen mitocondrial.

Bell y Jacobs (1990) estudiaron en culturistas de elite de ambos sexos, el incremento capilar viendo que es aproximadamente el mismo. El número de capilares/fibra en los deportistas fue mayor que en el grupo control, pero el número de capilares/ mm^2 era similar en todos los grupos.

En nadadores entrenados para resistencia, la media del área de fibra muscular, fue disminuyendo en la mayoría de los músculos entrenados (Nygaard, 1982) y en los corredores de maratón, sucede un hecho similar, manteniendo la proporción de capilares en las fibras ST. Kuzon y cols. (1990) en 11 jóvenes futbolistas de élite, comparados con un grupo control, en muestras de vasto lateral, determinan que el número de capilares es claramente mayor en los futbolistas. El número de los que rodean cada fibra, varía de $4,9 \pm 0,4$ en el control a $5,7 \pm 0,9$ en los deportistas y la densidad capilar de $220,8 \pm 38$ a $282,7 \pm 42$ respectivamente. Todo ello hace que la relación capilar/fibra también aumente de $1,7 \pm 0,1$ a $2,2 \pm 0,6$. Sin embargo, Wang y cols. (1993) no encuentran diferencia en la densidad capilar y en el número de capilares/fibra, estudiando biopsias del mismo músculo, antes y después de un periodo de 18 semanas de entrenamiento para resistencia.

Hepple y cols. (1997) con biopsias de vasto lateral en atletas de resistencia y velocidad de 65 a 74 años, concluyen que el número de capilares por perímetros de fibra, está aumentado en ambos grupos de deportistas, mientras que la densidad capilar aumenta solo en el entrenamiento aerobio de los velocistas.

En la inmovilización, el número de capilares por fibra disminuye, sin que aparezca todavía una disminución en el tamaño de la fibra (Saltin y Rowell, 1980), pero la inanición no parece que influya en la cantidad de capilares.

5.3.- CAPACITACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS SATÉLITES.

El papel atribuido por Moss y Leblond (1971) a la población de células satélites, como reserva de células para el mantenimiento, crecimiento y reparación del tejido muscular, nos lleva a tener en cuenta sus variaciones durante el crecimiento impuesto o no por el ejercicio.

Hay estudios sobre la dotación del ADN contenido en el músculo esquelético durante el crecimiento normal y en el entrenamiento deportivo (Hamosh y cols., 1967; Hubbard y cols., 1985), que podría interpretarse como un indicio de adición de nuevas fibras. Parte de este incremento de ADN está asociado a la proliferación de las células satélites del músculo que son incorporadas a las fibras preexistentes (Moss y Leblond, 1970), mecanismo que se ha propuesto ya como una forma de mantener constante la proporción núcleo/citoplasma, cuando este último aumenta por la hipertrofia (Shafiq y cols., 1968; Schiaffino y cols., 1976; Schmalbruch, 1978).

En este aumento de DNA, no debemos olvidar que también está implicado en el tejido conectivo que rodea la fibra muscular (Armstrong y cols., 1974), además de haber observado que al bloquear la síntesis del DNA, no se impide la hipertrofia de la fibra, como demuestra Fleckman y cols. (1978) en el soleo de la rata.

Sabemos que los núcleos que aparecen como nuevos en la célula muscular, no se sintetizan dentro de ella, sino que proceden de la proliferación de células satélites adyacentes. Bischoff (1986) demostró al estudiar cultivos de células satélites, en contacto con células musculares maduras y estimulando con mitógenos, que estas células, que en el adulto se mantienen en fase G0-G1 del ciclo celular, son capaces de activarse, multiplicarse y diferenciarse en mioblastos, para fusionarse en células multinucleadas parecidas a los miotubos, con posibilidad de unirse a la célula muscular.

Este proceso está influenciado por factores de crecimiento que están siendo estudiados en la actualidad. McLennan y Koishi (1997), estudiando músculos lesionados en los que se produce una invasión de células hematopoyéticas durante el proceso de reparación de la necrosis, llaman la atención sobre la falta de fusión de células satélites, mientras existe en el microambiente el factor de crecimiento y transformación $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$). Cuando las células hematopoyéticas desaparecen de la zona, después de reparado el tejido conjuntivo, empieza a aumentar el TGF- $\beta 2$, que parece estimular la formación de miotubos in vivo, a partir de las células satélites locales activadas. Con otro protocolo para ver el efecto de la radiación en el músculo esquelético, Phelan y Gonyea (1997)

ponen de manifiesto el papel activador para células satélites, del factor de crecimiento insulina-like, producido por los miocitos.

La velocidad de proliferación y la tasa de fusión son compatibles con la hipótesis según la cual, las células satélites fijan todos sus núcleos pegados a la fibra en crecimiento y confirman la observación de Kelly (1978), que detectaba un aumento de núcleos marcados con H3-timidina, en la zona de crecimiento del tejido muscular, primero en las células satélites y luego en las fibras. Recientemente, Robertson y cols. (1992) han demostrado por primera vez que, la diferenciación de células miogénicas, localizadas geográficamente entre el plasmalema y la lámina externa de los miocitos, en posición de células satélites, pueden fusionarse directamente con segmentos íntegros de plasmalema de miocitos maduros. Esta población celular, continúa presente durante toda la vida del individuo (Campion y cols., 1982), pero varía en número durante el crecimiento, como vemos por los protocolos de diferentes autores (Enesco y Puddy, 1964; Rowe y Goldspink, 1969; Ontell y Dunn, 1978), que además nos hablan de una gran diferencia entre especies y tipos de músculos.

Aloisi y cols. (1973) fueron los primeros en publicar que la frecuencia de las células satélites en músculos lentos como el soleo, es 3 veces más alta que en los músculos rápidos como el EDL. Schmalbruch y Hellhammer (1977) lo confirmaron y Kelly (1978) lo estudió en músculos en crecimiento. Este último autor determinó que el 5% de los núcleos situados bajo la membrana basal en el soleo de la rata adulta, corresponde a células satélites, mientras que en el EDL sólo llegan al 0,4%. Por denervación, el porcentaje medio para el soleo aumenta desde 4,1 a 8,5% y en el EDL desde un 1,2 a un 4,1% (Snow, 1983).

Las experiencias de Schultz (1984) de trasplantes cruzados de soleo en EDL, demuestran que el porcentaje de células satélites de cada tipo metabólico, está perfectamente conservado después del trasplante, mientras que en el trasplante inverso, de EDL a soleo, el músculo regenerado presenta un porcentaje más elevado de células satélites, característico del músculo lento (Schultz y cols., 1988).

En biopsias del músculo vasto lateral externo en atletas escaladores, después de la exposición a grandes alturas, se observa un aumento en el número de células satélites y mionúcleos del 215% (Martinelli y cols., 1990).

La regulación de estas variaciones parece que se opera por el número de divisiones mitóticas proliferativas, asimétricas y cuantales, posiblemente bajo el control del sistema nervioso, que precisan una investigación más amplia. Siguiendo esta línea, Kameda y cols. (1993) han demostrado que las células satélites de músculo de rata en cultivo, son en su mayoría inmunonegativas para MoAb marcadores de diferentes tipos

de fibras, pero si se añaden fragmentos de nervio raquídeo al cultivo, se forman los primeros miotubos a partir de ellas, que ya sí responden a los diferentes marcadores.

Esser y cols. (1993), han estudiado las isoformas de proteínas miofibrilares expresadas por estas células en los procesos de regeneración y han visto que son similares a los que expresan los mioblastos de segunda generación, MHCemb y MHCneo, pero no MHC β /s, que aparece en estadios posteriores, cuando ya hay fusión entre ellas o con un miocito.

5.4.- CAMBIOS EN EL CONTROL NERVIOSO DE LA UNIDAD MOTORA.

Las observaciones de Eccles y cols. (1962) sobre la inervación muscular, les llevaron a observar que las propiedades contráctiles del músculo, están asociadas con las frecuencias características de los impulsos que recibe. Por ello, el tipo de entrenamiento que desarrolla un atleta, va a variar tanto la cantidad como la intensidad de los estímulos que reciba el músculo, para un determinado trabajo. La forma en que estos mecanismos tienen lugar, continúa siendo objeto de numerosos estudios.

Sabemos ya desde los trabajos de Tello (1917) que durante el desarrollo prenatal y postnatal inmediato, todos los músculos presentan una poliinervación extensa, y Dennis y cols., (1981) determinan que en estos estadios del desarrollo, cada fibra muscular recibe estímulos desde diferentes motoneuronas. Esta poliinervación tiene un especial interés en el complicado mecanismo de control neuronal, durante la diferenciación del tipo de fibras (Gordon y van Essen, 1985), que según vimos en las aportaciones de Porter y Baker (1992), se produce paralelamente en la unión neuromuscular.

Se ha cuestionado con frecuencia si la conversión de las propiedades del tipo de fibras del músculo, de ST a FT o viceversa, dependería exclusivamente de la frecuencia de estimulación o de una sustancia neurotrófica segregada por el nervio y por tanto independiente de la frecuencia del impulso. Lowry y cols. (1980) encontraron que la estimulación directa puede jugar un papel regulador en las propiedades contráctiles del músculo y en última instancia el nervio motor es dominante, pero Eldrige y Mommaerts (1980), con otro protocolo experimental, demostraron que el determinante primario de estas propiedades contráctiles de la fibra muscular era tanto la actividad eléctrica como los factores neurotróficos. Cuando el nervio está intacto, pero eléctricamente silencioso, como ocurre en la sección traumática de la médula espinal, hay un cambio en la proporción de fibras musculares, pasando del predominio ST al de FT en el músculo, por tanto, para mantener las propiedades de contracción lenta, el nervio debe permanecer activo. También sabemos por los trabajos de Bernardi y cols. (1997), que un músculo puede reclutar estratégicamente, unidades motoras, dependien-

do del tipo de trabajo al que es sometido, afectando tanto a los agonistas como a los antagonistas.

Los procesos de reinervación de un músculo previamente denervado, deben hacerse a partir de motoneuronas que normalmente inervan fibras con las mismas características de contracción. Si se hace invirtiendo el tipo de inervación, también cambian las propiedades musculares, hacia las que determina la nueva inervación (Barany y Close, 1971; Close, 1972; Hoh, 1975 y Kelly y Rubinstein, 1980; Chammas y cols 1995). Para Oda (1985) hay una correlación directa entre el tamaño de la placa motora y el diámetro de la fibra en cada grupo muscular.

Estos datos fueron confirmados y ampliados por Zajac (1989) que estudió las señales de control neural en las transformaciones del músculo esquelético, analizando parámetros específicos, durante la excitación-contracción en la generación de fuerza. La estimulación continua de un nervio, lleva a la formación de placas motoras ectópicas. Estas placas son de menor tamaño que las preexistentes y muestran signos de transformación de rápidas a lentas. Parece que los tipos de placas son controlados por la influencia integrada de todos los impulsos axonales (Lomo y Waerhaug, 1985).

El uso sistemático de diferentes unidades motoras, o grupos de fibras musculares inervadas por una misma fibra nerviosa, en respuesta a distintas demandas fisiológicas, depende de la existencia de un procedimiento ordenado para su reclutamiento por el sistema nervioso central. El mecanismo está basado en la existencia de motoneuronas de diferente tamaño, umbral de activación y velocidad de conducción. Estas propiedades de los nervios fueron identificadas por Hursh (1939) y Rushton (1951). Su importancia en el control de reclutamiento motor fue elaborada por Henneman y Olson (1965). Las fibras de tipo ST están inervadas por nervios pequeños de bajo umbral y conducción lenta. Son motoneuronas de descarga tónica y baja frecuencia. Las fibras FT en cambio dependen de nervios grandes, de alto umbral y rápida conducción, procedentes de motoneuronas de impulsos crónicos y frecuencia alta variable (Sieck y Prakash, 1997).

Con el entrenamiento, el tiempo para producir una fuerza determinada se reduce considerablemente (Hakkinen y cols., 1990) desde 161 ± 107 ms a 93 ± 65 ms para 500 Nw. En atletas femeninos, el entrenamiento juega un papel importante en la adaptación a un trabajo inducido en el sistema nervioso para desarrollar fuerza muscular.

La necesidad de conseguir un mapa de distribución de unidades motoras, ha sido planteada por autores como McComas y Thomas (1968), McComas y cols. (1971), y Garnett y cols. (1978), quienes por medio de estudios electrofisiológicos, llegaron a la conclusión de que guardaban similitudes con otras especies. De sus estudios se deduce que todas las fibras inervadas por un mismo tipo de placa motora son homogéneas,

como lo prueban su composición histoquímica y sus propiedades metabólicas, reflejadas en el tipo de contracción (Kugelberg y Lindergren, 1979).

Por otro lado, se comprobó que las fibras inervadas por una misma fibra nerviosa, raramente aparecen próximas unas a otras, estando distribuidas en una amplia superficie de corte (Eisen y cols., 1974). Para la especie humana, Buchthal y cols. (1974) llegaron a determinar puede haber de 15 a 30 unidades motoras contenidas en 5 - 10 mm² de superficie muscular, pero el número de fibras por unidad motora varía de unos músculos a otros, así vemos como es aproximadamente de 110 en el músculo lumbricalis y de 1.720 para el gastrocnemio medio (McComas y cols., 1971).

Recientemente McMillan y Hannan (1991), determinaron el territorio de la unidad motora en el músculo masetero humano con métodos electrofísicos, y vieron que tienen una extensión de $8,8 \pm 3,4$ mm, con orientación preferentemente anteroposterior, siguiendo el eje mayor de la célula, dividiendo a ésta en compartimentos anatómicos de control independiente. Según otro ejemplo, Larsson (1992) estudió la diferente reactividad a la SDH entre las fibras que formaban unidades motoras concretas, del tibial anterior de la rata, con resultados de medidas constantes para diferentes edades y dependiendo de la posición de la fibra en el músculo, siendo un 21% menores en la superficie que en la zona media e interna. Esta diferencia sistemática de las fibras de una misma unidad motora, representa un hecho biológico más que un fenómeno metodológico y depende del músculo y especie estudiada.

5.5.- POSIBILIDAD DE CAMBIO EN EL TIPO DE DOTACIÓN FIBRILAR DEL MÚSCULO CON EL EJERCICIO.

Las fibras musculares esqueléticas se han clasificado en base a sus propiedades contráctiles y pueden ser identificadas por las características histoquímicas, inmunológicas, electroforéticas y bioquímicas de sus proteínas miofibrilares. Todos estos medios de trabajo han permitido la demostración del crecimiento en el número y longitud de las miofibrillas dentro de la célula muscular, así como la adición de nuevos elementos a partir de las células satélites, que justifica el aumento total de masa muscular. Pero aun persiste el dilema de la posible transformación entre los diferentes tipos de fibras de un músculo dado, en adaptación a un tipo de contracción rápida o lenta demandada por un ejercicio concreto.

La interconversión de las fibras implicaría cambios en las propiedades contráctiles y en la forma en que estas fibras son utilizadas durante el ejercicio. Sabemos que la mayoría de los músculos de los mamíferos presentan todos los tipos de fibras descritos en el apartado 3.3, en proporción que varía según el tipo de ejercicio al que están destinados, pero la posibilidad de un cambio metabólico sustancial que permita la transformación de unos tipos en otros, aun no está demostrado.

En el caso de valoración de estos cambios con el ejercicio, la conversión lógica corresponde a un incremento de fibras ST en respuesta al entrenamiento de resistencia, y un aumento en el porcentaje de fibras FT para aquellas actividades donde se requiera una contracción corta y explosiva (Edgerton y cols., 1969; Faulkner y cols., 1971). En este sentido podemos decir que el ejercicio produce en el músculo la hipertrofia de uno o más tipos de fibras y que lo produce en relación a cambios cuantitativos en el contenido miofibrilar, traducido en un incremento del área de corte. Si además hubiese una variación en la proporción del tipo de fibras, permitiría modificaciones completas y a voluntad de las características fisiológicas del músculo. Este hecho, hablaría a favor de conseguir resultados óptimos en un atleta inclinado a un tipo de ejercicio, aunque por el tipo de fibra muscular previamente desarrollado, el rendimiento se prevea bajo, siempre que el programa de entrenamiento complete este cambio progresivo en el desarrollo del tipo de fibra necesario para el ejercicio elegido.

Mero y cols. (1991) llevaron a cabo un estudio minucioso en niños de 11 a 13 años, en los que determinaron previamente su porcentaje de cada tipo de fibras, proponiendo después diferentes grupos, con un programa de entrenamiento adecuado o no, para el tipo de fibra predominante en cada uno. De sus resultados se desprende que la herencia afecta sólo parcialmente a la selección del deporte en el que se prevee mayor rendimiento, pero puede ser ampliamente modificado por el crecimiento, desarrollo y tipo de entrenamiento. La capacidad previa dependería del área de la fibra muscular, controlada por el sistema nervioso. No podemos olvidar que este desarrollo de un tipo de fibra muscular u otro, implicaría también variaciones en las placas motoras propias de cada tipo de fibra, que al fin y al cabo son las que parece que ejercen un control directo sobre su actividad (Close, 1972; Buchthal y Schmalbruch, 1980).

Atendiendo ya a casos concretos, vemos que son abundantes y dispares los datos aportados. Goldspink y Ward (1979), no han encontrado cambios en la proporción de los diferentes tipos de fibras, o en su número total, en el músculo en los levantadores de pesas. Sin embargo, había hipertrofia selectiva de algún tipo de fibra, dependiendo de la naturaleza del ejercicio y la localización del músculo. Aitken y cols. (1989) parten de hombres sanos a los que se somete a un programa de entrenamiento intensivo para fuerza y con muestras de vasto lateral, determinan que la proporción en los tipos de fibras varía, con un incremento de $5,9 \pm 2\%$ para las tipo IIa, una disminución de $6,3 \pm 2\%$ para las tipo I, manteniéndose constante las de tipo IIb ($0,4 \pm 0,9\%$).

Baker y Hardy (1989) estudian el proceso en canoistas y después de 9 semanas de entrenamiento, determinaron que la distribución de fibras no varía y la superficie de corte de las fibras tipo I no se altera significativamente, pero las de tipo II se incrementa en un 82%. Sin embargo, Kuzon y cols. (1990) no encuentra diferencias significativas en el porcentaje y áreas de cada tipo de fibras, entre futbolistas y hombres sedentarios

y Wang y cols. (1993), tras 18 semanas de entrenamiento para resistencia, encuentra una disminución en las IIb y un aumento en las IIa, con incremento de superficie y volumen en todos los tipos.

La diferente variación de los tipos de fibras entre hombres y mujeres, se ha valorado en el trabajo de Alway y cols. (1989), estudiando biopsias de bíceps braquial en culturistas de ambos sexos, implicando una proliferación que afectaba tanto a la hipertrofia de las fibras, como al número de ellas. Las fibras tipo II eran 1,6 veces mayores de tamaño en hombres que en mujeres, mientras que las tipo I presentaban superficies similares. Para este autor, estas aparentes adaptaciones pueden estar determinadas genéticamente. Bell y Jacobs (1990) desarrollan un protocolo similar comparando los dos grupos con otros dos grupos control, viendo como la proporción de fibras FT y ST es similar en mujeres control y con ejercicio, mientras que en el grupo masculino, las fibras FT aumentan más que las ST en hombres culturistas, en comparación con su respectivo grupo control.

Abernethy y cols. (1990) apoyan la teoría de que el ejercicio puede producir transición entre FT y ST. En sprinters entrenados hay un claro aumento de fibras FT en detrimento de las ST y en los atletas de resistencia hay un cambio desde el predominio FTb a FTa y un aumento en ST. Para estos autores, el cambio se produciría de FTb $\Rightarrow$ FTa $\Rightarrow$ FTc $\Rightarrow$ ST, aunque también valora la posibilidad de que el alto porcentaje de fibras ST sea el resultado de una selección natural.

La clase de miosina que contiene cada tipo de fibra, va a determinar las diferencias básicas entre las distintas unidades motoras (Weeds, 1978). Estas diferencias hasta ahora se habían demostrado atendiendo a sus propiedades de contracción, rápida o lenta, que ya hemos planteado (Peter y cols., 1972; Fitts y Holloszy, 1977), pero las nuevas vías abiertas por la biología molecular en el estudio de miosinas y su determinación genética, ofrecen medios más rigurosos para valorar esta posibilidad de cambio.

La primera de estas situaciones de cambio se encuentra después del nacimiento. En este momento las fibras musculares estriadas de los mamíferos presentan unas propiedades contráctiles semejantes a las ST del músculo adulto (Buller y cols., 1960). En el periodo postnatal inmediato, la miosina del músculo fetal, inicialmente indiferenciada, cambia en algunas de ellas, tomando características asociadas a la miosina de fibras FT maduras (Drachman y Johnston, 1973; Whalen, 1980). La presencia de más o menos cantidad de cada miosina en el músculo fetal, es debida probablemente a la existencia de poliinervación en esta fase del desarrollo, que desaparece al madurar. La velocidad de cambio está en función del tamaño inicial de la fibra al nacimiento y la forma de empleo en la especie madura (Buller y Lewis, 1965; Close, 1972).

Este hecho de que una fibra muscular pueda contener proporciones diferentes de cada clase de miosina, aunque funcionalmente predomine uno de ellos (Kelly y Rubinstein, 1980; Weeds, 1978), posibilitaría la interconversión de los tipos de fibras en respuesta a perturbaciones experimentales como uso y desuso crónicos. Por tanto, la demostración de una clase de proteína contráctil en un tipo de fibra muscular, no excluye la existencia de los demás tipos.

Heylig y Pette (1980) demostraron en el sóleo de diferentes especies de mamíferos, la presencia de distintos RNAm en todos los tipos de fibras, que codificaban moléculas equivalentes en las cadenas ligeras de miosinas diferentes para determinar la diferenciación en fibras FT y ST. Estos diferentes fenotipos son el resultado de la transcripción de genes diferentes. Roy y cols. (1982) ya lo habían demostrado para las subunidades "a" y "b" de la tropomiosina. En el mismo trabajo, Heylig y Pette (1980), aportan las primeras observaciones sobre la aparición de cadenas L de miosina lenta en músculos con fibras FT estimulados para trabajo de resistencia y sugieren que la transformación inducida en la cadena L de la miosina es debida a un cambio en la transcripción genética.

Autores como Adams y cols (1993) ahondan en este planteamiento de cambios en los fenotipos de miosinas y continúan la línea de trabajo propuesta por Hather y cols (1991) que determinaron que el entrenamiento para resistencia aumenta el porcentaje de fibras tipo IIa y disminuye el tipo IIb. Ellos plantearon las variaciones de la cadena pesada de miosina (MHC) de estos subtipos y vieron que no había variaciones en las fibras tipo I, mientras que la proporción de la cadena MHCIIb, disminuye de 19 ± 4 a $7 \pm 1\%$ y aumenta desde 48 ± 3 a $60 \pm 2\%$ en la MHCIIa. A la vez el porcentaje de fibras IIb disminuye de 18 ± 3 a $1 \pm 1\%$ y las IIa aumenta de 46 ± 4 a $60 \pm 3\%$. Concluyen que el entrenamiento para resistencia altera la composición de la MHC del músculo esquelético humano, apoyando la teoría de la aparición de un cambio en la expresión genética.

El grupo de Andersen (1994) plantea un protocolo similar para atletas de velocidad, estudiando con electroforesis los tipos de MHC, sin encontrar diferencias significativas con el grupo control.

En los primeros estadios de desarrollo, los transcritos de las tres isoformas MHC de músculo rápido, siguen distintos patrones de distribución en cada fibra de los diferentes músculos. La MHCf adulta esta inicialmente coexpresada con las MHCemb y MHCneo, que progresivamente desaparecen en los primeros meses de vida, aunque persisten más en las fibras tipo IIa. Estas isoformas, en el músculo humano, siguen experimentando cambios con la edad y no están completamente establecidas hasta la edad adulta, dependiendo del tipo de vida y cantidad de ejercicio que desarrolle cada persona o animal considerado (Schiaffino y Reggiani, 1996).

**o
b
j
e
t
i
v
o
s**

6.- OBJETIVOS.

Durante las últimas décadas, la idea de que una cierta actividad física realizada con regularidad, es capaz de mejorar el nivel de vida del individuo, tanto si lo planteamos como factor preventivo, o como método de rehabilitación de enfermedades, se ha extendido ampliamente entre la población. Esto unido a la continua lucha por la superación de las limitaciones físicas del ser humano, ha llevado a numerosos autores al estudio exhaustivo de la composición de la fibra muscular (Huxley y Hanson, 1954; Moss y Leblond, 1971; Wang y cols., 1979; Tokuyasu y cols., 1983; Ordahl y Le Douarin, 1992; Scchiafino y Reggiani, 1996), su funcionamiento (Ogata, 1958; Dubowitz y Pearse, 1960; Schiaffino y cols., 1970; Ogata y Yamasaki, 1985; Billeter y Hoppeler, 1994) y sus variaciones a lo largo del entrenamiento.

Pero a pesar de la larga lista de publicaciones, todavía no se ha llegado a marcar un patrón de comportamiento definitivo, que oriente sobre la forma de ejercicio físico necesario para cada persona, o la preparación de programas de entrenamiento que consigan la mejor puesta en forma para un rendimiento óptimo.

Las fibras musculares estriadas esqueléticas, constituyen una población heterogénea de células, cuya importancia en el mantenimiento del equilibrio del organismo y la forma de adaptabilidad a diversas necesidades, todavía no está bien establecida, aunque se está empezando a comprender (Gollnick y cols., 1972; Sjoogard, 1982; Sjöström y cols., 1987; Always y cols., 1989; Neuffer y cols., 1996). Esta heterogeneidad se expresa por diferencias en sus características propias, como son la morfología, organización estructural, actividad enzimática, propiedades de su superficie celular y de la organización del citoesqueleto y capacidad funcional.

En conjunto, estas características determinan el fenotipo de las células, que difiere en las distintas circunstancias, como son las sucesivas fases de su desarrollo, el estado de actividad, la proporción variable de los tipos de células musculares en cada músculo y lo que es más habitual, una combinación de todos los factores.

El propósito de este trabajo ha sido estudiar cualitativa y cuantitativamente los cambios en las poblaciones de células musculares estriadas esqueléticas del músculo vasto externo, en condiciones de vida sedentaria y de vida deportiva, en sus dos vertientes, es decir, con ejercicio destinado a desarrollar resistencia, como el ciclismo, y con ejercicio destinado a desarrollar velocidad, como los corredores de distancias cortas.

Se ha elegido este modelo experimental, porque en él se han establecido ya una serie de cambios previos, que lo condicionan para obtener unos resultados seguros y útiles, que pueden significar una relación entre el tipo de fibra muscular existente y el rendimiento que aportan las variaciones que el ejercicio induce en ellas. Para llevar a cabo este estudio, se establecieron los siguientes enfoques:

1.- Determinar los cambios ultraestructurales desarrollados a lo largo de la práctica deportiva en cada una de las modalidades planteadas.

2.- Caracterizar mediante marcadores enzimáticos la localización y los cambios experimentados por los diferentes tipos de fibras musculares, durante el periodo de entrenamiento considerado.

3.- Establecer los cambios cuantitativos en la población de células musculares esqueléticas con el ejercicio y correlacionarlos con los datos aportados por los procedimientos morfológicos e histoquímicos.

4.- Correlacionar estos datos con los cambios producidos en la vascularización del tejido conjuntivo circundante y en relación con la modalidad y duración de la actividad deportiva.

ABRIR MATERIAL Y MÉTODOS

