

Diferenciación histoquímica, inmunohistoquímica y electroforética de diferentes tipos de fibras musculares

• *Introducción y objetivos:*

En esta práctica intentaremos diferenciar entre los distintos tipos de fibras que componen el músculo esquelético. Este tipo de tejido está altamente organizado, especializado en la ejecución de la actividad contractil, implicada en multitud de eventos corporales de cualquier sistema vivo.

El músculo esquelético, junto al cardíaco, forma parte del músculo estriado. Se denomina así, por el aspecto que presentan los cortes de tejido al microscopio óptico. Esto se debe a la organización sarcomérica que presenta, con las características bandas Z, I, A, H y la línea M. A diferencia que el músculo liso, que carece de esta disposición ordenada de las fibras, además de poseer otras características metabólicas y de innervación diferentes.

Esta alta organización del músculo esquelético hace pensar que todo es homogéneo, y nada más lejos de la realidad. Aún en un mismo músculo puede haber fibras con diferentes propiedades metabólicas y diferente capacidad contractil, lo que las hará responder ante un estímulo de diferente manera.

El hecho de ser estructuras extraordinariamente plásticas, hace que se pueda adaptar a sobretabajos desarrollando estructuras para soportarlo, y a la vez, que exista atrofia en caso de no utilizarlo.

El objetivo de esta práctica es poner de manifiesto esta heterogeneidad celular del músculo esquelético y la diversidad de propiedades metabólicas y contráctiles de las fibras constituyentes; analizar la presencia de proteínas marcadoras que puedan servir para identificar las fibras y comparar mediante electroforesis la composición molecular de diferentes tipos de músculo.

• *Fundamento teórico*

Como sabemos el músculo esquelético se compone de fibras (denominadas así por su elevada relación longitud/sección). En los mamíferos, la innervación del músculo esquelético es mononeural, o lo que es lo mismo, una fibra es innervada por una neurona, pero una neurona puede innervar a varias fibras. Es cierto también, que una neurona está en contacto siempre con el mismo tipo de fibra, y por eso, podemos definir la relación *neurona*"fibras como **unidad motora**. Las diferentes unidades motoras que pueden componer un músculo pueden activarse de forma independiente, consiguiendo así una regulación de la intensidad de la contracción.

Estas fibras son el resultado de la fusión de células, llamadas *miocitos*, durante el desarrollo. Los sincitios presentan en su interior las miofibrillas, que están envainadas por el retículo citoplasmático, al que denominamos *retículo sarcoplásmico*. Las miofibrillas constan de sucesiones de sarcómeros unidos por el disco o banda Z, que se ve rodeado por el túbulo T. Este túbulo es una invaginación de la membrana que permite poner en contacto la membrana plasmática con el retículo sarcoplásmico. El túbulo T está en contacto, a todo lo largo de la circunferencia del sarcómero, con las cisternas terminales. Éstas son el resultado de un ensanchamiento del retículo sarcoplásmico. Esta relación entre membranas (plasmática, túbulo T y cisternas terminales) es esencial para la regulación de la contracción muscular.

El sarcómero

La organización sarcomérica es tal, que no se aleja mucho de una disposición totalmente cristalina, sobre todo en músculos que requieren una gran potencia, como los de vuelo de la mosca. La visión de bandas es el

resultado de la colocación de dos tipos de proteínas esenciales:

- Actina, que forma parte esencial de los filamentos delgados.
- Miosina, que forma parte integral de los filamentos gruesos.

En un corte transversal de un sarcómero, se observa que un filamento delgado se rodea de tres gruesos, y como se muestra en la figura, uno grueso se rodea de seis delgados. La contracción se produce gracias a la conversión que realiza la cabeza globular de la miosina, de la energía de hidrólisis del ATP a energía mecánica. La contracción se debe al acortamiento de las zonas I y H, por el desplazamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos. Es importante la polaridad de los filamentos de actina, ya que si no el desplazamiento se realizaría en sentido contrario, desplazándose la estructura sarcomérica en lo que sería elongación, no contracción.

La actividad ATPasa se localiza en la cabeza globular de la miosina, y es el motor molecular más antiguo que se conoce. El estudio de su estructura y su actividad ha permitido caracterizar otro tipo de proteínas que permiten el movimiento, no solo sobre actina, sino sobre microtúbulos, no habiéndose caracterizado ninguna que deslice filamentos intermedios.

En el sarcómero no sólo hay actina y miosina, sino que existen toda una serie de proteínas que hacen posible su funcionamiento:

Proteína	Estructura y Componentes		Localización	Función			
Miosina	Formación de estructura superenrollada cada dos moléculas y posterior asociación con polaridad enfrentada. El eje de simetría se encuentra en la línea M	2 cadenas pesadas	Componente principal de los filamentos gruesos	Con un sitio de interacción con la actina y otro con función ATPasa que es la que desarrolla el esfuerzo mecánico	4 cadenas ligeras (LC1, LC2 y LC3)		
		Se asocian a las cabezas de las cadenas pesadas, dos por cabeza.					
Actina	Asociación de monómeros que da lugar a un filamento con estructura similar a una doble hélice		Componente principal de los filamentos delgados	Permiten el deslizamiento sobre los filamentos de miosina			
Tropomiosina	Proteína con cremallera de leucina que se asocia en forma cabeza"cola		Asociada a los filamentos de actina enrollándose en los surcos que deja.	Implicada en la estabilización de los filamentos de actina y en la regulación de la contracción al tapar el sitio de			

				unión a miosina en ausencia de Ca^{++}			
Troponina	Forman un complejo de tres proteínas	Tn" ^T		En la unión cabeza cola de la tropomiosina	Tn" ^T y Tn" ^I unen TN a TM mientras que Tn" ^C es la unidad reguladora con capacidad para 4 iones Ca^{++} . Las tres están implicadas en el cambio de lugar de TM cuando se une calcio, dejando activo el sitio de unión a la miosina	Tn" ^I	
						Tn" ^C	

Proteína	Estructura y Componentes	Localización	Función
Titina o Conectina	Proteína muy larga y flexible	Entre la línea M y el disco Z	Permite unir la miosina a los discos Z (a pesar de la contracción, pues es flexible). Además de mantenerla paralela a los filamentos de actina
Nebulina	Proteína flexible pero inextensible	Unida al disco Z	Orienta la polaridad de los filamentos de actina además de unirlos al disco Z y mantenerlos paralelos
"actinina	Formada por dos cadenas	En el disco Z	Unión de la actina en la zona del disco Z. En músculo liso hace las funciones del disco Z junto a la vinculina
Miomesina		En la línea M	Mantiene el eje de simetría de la asociación de la miosina en la línea M
Proteína C		A ambos lados de la línea M	Unida a la miosina
Cap"^Z		En el disco Z	Unión de l polo + de la actina al disco Z y evita que polimericen más monómeros de actina
Tropomodulina		En el extremo " de los filamentos de actina	Evita la despolimerización de los filamentos de actina

Regulación de la contracción en el músculo esquelético

El movimiento de contracción del sarcómero se explica gracias a modelos de interacción entre la miosina y la actina. Todo comienza cuando la miosina, unida a la actina, une ATP. En ese momento se despegar de la actina cambiando su conformación durante la hidrólisis del ATP. Al finalizar el proceso de hidrólisis, la miosina (con ADP + Pi en el sitio de unión a ATP), ha estirado el cuello, fijándose a otra subunidad de actina, de la cual no se despegará. Al salir del ADP + Pi, la conformación de la cabeza de miosina cambia de nuevo al estado original. Como no se ha soltado de la actina, hace que el filamento se desplace.

El método de movimiento es esencialmente igual para toda la familia de las miosinas, lo único que cambia es la cola que bien puede ser larga y estar unida a otra en un sarcómero, o corta asociada a otra corta o corta y suelta.

Este movimiento se puede producir *in vitro*, únicamente hace falta la actina, la miosina el calcio y el ATP. Sin embargo, *in vivo*, las cosas necesitan regularse, y en este caso muy finamente. Es el calcio el principal regulador de la actividad muscular, algo lógico, ya que manejar la otra variable, el ATP no es lógica, recordemos que tenemos que hacer caso a estímulos rápidos. La regulación se resume en esta figura.

- *Etapas de despolarización.* Se manda un mensaje vía neuronal, como onda de despolarización. La onda pasa por el túbulo T al ser este un continuo de la membrana. A ese estímulo responde un canal sensible a despolarización, ubicado en la membrana del túbulo, pero orientado hacia la cisterna terminal, iniciando la segunda etapa. En cuanto al sarcómero hay que destacar que la miosina no está unida a la actina ya que la TM se dice que está en *off* porque obstruye el sitio de unión de la miosina.
- *Etapas de salida de Calcio.* La despolarización ha llegado al canal que libera al sarcoplasma la concentración de 10 mM que tiene este ion en la cisterna terminal (no en forma libre, sino unido a una proteína llamada calsecuestrina). El calcio llega a la Tn^C, capaz de unir 4 iones, y hace cambiar la disposición de las dobles hélices de TM sobre la actina, dejando libres los sitios de unión de la miosina.
- *Etapas de captura de calcio.* Una vez recuperada la polaridad, se cierra el canal y comienza a funcionar una bomba Ca⁺⁺-ATPasa, la cual introduce dos cationes por molécula de ATP gastada. Al disminuir la concentración de calcio en el sarcómero, se vuelve a la configuración inicial, no pudiendo la miosina unirse a la actina.

Este tipo de regulación no es válida para músculo liso, con una contracción más lenta, ya que en este no hay TN, sustituyéndolo por calmodulina, las bombas de calcio son isoformas más lentas y, además, no presenta estructuras de membrana tan especializadas.

Fibras rápidas y lentas

En la actualidad, la puesta a punto de nuevas técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, han permitido corroborar lo que se había observado por técnicas de microscopía o electroforéticas. Esto es: **las fibras de los músculos esqueléticos de vertebrados son heterogéneas en su velocidad de contracción.**

El desarrollo de variedad de fibrillas de músculo esquelético responde a una tendencia evolutiva que se ha tratado de resolver de diferentes formas según avanzaba el tiempo. Se trata, por tanto, de poder responder a dos exigencias básicas:

- **Estímulos potentes de forma rápida.**
- **Estímulos menos potentes pero que se alargan en el tiempo.**

En definitiva, la velocidad de reacción frente a la resistencia ante un ejercicio físico. Ambas son necesarias para la supervivencia de un individuo. En el hombre, como buen generalista no posee ningún músculo que esté mayoritariamente formado por un solo tipo de fibras. El resultado en un corte transversal de un músculo, es un mosaico de fibras rápidas y lentas. Sin embargo, si hay mamíferos que poseen músculos compuestos

casi en su totalidad de fibras de un solo tipo.

Nosotros, en estas prácticas vamos a utilizar como modelo de músculo preferentemente lento el músculo soleo. Procede grupo extensor del tobillo de la extremidad posterior, y se asocia con dos músculos más. El soleo tiene actividad en el mantenimiento de la postura sufriendo un ligero aumento durante la locomoción. Como modelo de músculo rápido utilizaremos el músculo extensor de los dedos largos (EDL), de roedor. El músculo debe responder a estímulos rápidos en un tiempo mínimo, aunque se agote enseguida la energía.

Las diferencias entre los distintos tipos de fibras son, tanto metabólicas, como fisiológicas. Ambas, en su conjunto proporcionan a cada una las características necesarias para realizar bien su función.

Las fibras rápidas necesitarán una innervación rápida y un método de obtención de energía igualmente rápido. Para conseguirlo, se fabrican isoformas de las proteínas descritas anteriormente o proteínas nuevas (como la cadena ligera de miosina LC3, sólo presente en este tipo de fibras). Además, se ve potenciada la vía de obtención de energía más rápida que poseemos, la **glucolisis**. Con esto se consigue un menor rendimiento de la glucosa y un rápido agotamiento de los recursos, lo que conlleva inexorablemente a la fatiga de la fibra en un corto periodo de tiempo. La glucolisis no requiere oxígeno, de modo que, ¿porque gastar energía en fabricar mioglobina y capilarizar en exceso la fibra?. Ya que no se van poder alargar las contracciones con el tiempo, habrá que agrandar la sección de la fibra para que la contracción sea más eficaz y violenta.

Las fibras lentas necesitarán de isoformas más lentas, ya que una contracción demasiado rápida llevaría a agotar las energías, al igual que sucedía en las fibras rápidas. El poder alargar los periodos de contracción da como posibilidad la utilización de una vía de obtención de energía mucho más lenta pero mucho más eficaz, **el ciclo de los ácidos tricarboxílicos**. Esta ruta metabólica requiere oxígeno y no mucha glucosa, de modo, que no hace falta mucho almidón (al contrario que en las fibras rápidas), pero si que hay que fabricar mioglobina y hacer que llegue suficiente oxígeno capilarizando la zona. Evidentemente, si necesitamos el ciclo de respiratorio, tendremos muchas mitocondrias. Los citocromos respiratorios junto a una mayor irrigación de las fibras, hacen que a simple vista podamos diferenciar los dos tipos de fibras, ya que las oxidativas tendrán un tono más rojizo que las rápidas, carentes de componentes de color rojo.

Los diferentes rendimientos de las rutas glucolítica y oxidativa se pone de manifiesto en esta tabla.

	Tasa relativa	Glucosa utilizada	Lactato producido	¿O2 necesario?
<i>Metabolismo Oxidativo</i>	36"38 ATP	1	0	Si
<i>Metabolismo Glucolítico</i>	64 ATP	32	64	No
Las vías glucolíticas producen menos ATP por glucosa que las oxidativas, pero pueden estar activas con una tasa de producción de ATP más elevada.				

Estos serían los dos extremos, ya que entre medias existen una gran variedad de fibras más o menos rápidas, más o menos oxidativas. Para repasar todo esto realizamos la siguiente tabla.

Propiedades fisiológicas y bioquímicas de los tipos de fibras de los músculos de mamíferos			
Clasificación Bioquímica	RG	ROG	LO
	<i>Rápidas glucolíticas</i>	<i>Rápidas oxidativas"glucolíticas</i>	<i>Lentas oxidativas</i>
Clasificación fisiológica	RF	RR	L
	<i>Fatigables rápida</i>	<i>Rápidas resistentes a fatiga</i>	<i>Lentas</i>
Velocidad de contracción	Rápida	Rápida	Lenta

Actividad ATPasa de la miosina	Alta	Alta	Baja
Fuente de producción de ATP	Glucolisis	Oxidativa o mezcla	Oxidativa
Contenido de mioglobina	Bajo	"	Alto
Mitocondrias	Pocas	Muchas	Muchas
Capilares	Pocos	"	Muchos
Contenido de glucógeno	Alto	Intermedio	Bajo
Tasa de fatiga	Rápida	Intermedia	Lenta
Diámetro de la fibra + cantidad de tensión	Grande	Intermedio	Pequeño

Al principio del apartado, comentamos que la evolución había desarrollado, a lo largo del tiempo, soluciones alternativas más o menos similares, pero siempre orientadas a poder responder a los dos tipos de estímulos.

En peces, los músculos del miotomo (tronco corporal) están divididos en regiones separadas de músculos rojos lentos y blancos rápidos. Las fibras musculares de estas regiones tienen muchas semejanzas histológicas, bioquímica y fisiológicas con las fibras de mamífero LO y RG respectivamente. El músculo lento nunca excede del 25% de todo el miotomo. Esto es debido a que solamente se usa el músculo lento en la natación lenta o moderada. El músculo rápido se utiliza en periodos cortos de tiempo ya que se fatiga muy rápidamente. Además de las diferencias que comparten con los mamíferos, ancho de fibra y capilarización, presentan una diferencia más, y es el tipo de inervación, que se efectúa por una neurona en un extremo de la fibra rápida, mientras que una neurona de unidad motora lenta inerva en varios puntos a una misma fibra.

En artrópodos, se manifiesta una distribución similar entre fibras rápidas y lentas. Aunque las bases metabólicas de esta distinción aún no están claras. Si que parece existir una correlación con el tamaño del sarcómero y la cantidad relativa entre filamentos gruesos y delgados. De esta forma, las fibras de contracción rápida presentan sarcómeros más cortos (1,5"3 m) y una proporción relativamente baja de filamentos delgados. Sin embargo, las fibras de contracción rápida presentan sarcómeros más largos (6"15 m) y una proporción elevada de filamentos gruesos.

Las fibras suelen estar en forma de mosaico en los músculos del animal, pero si hay músculos preferentemente especializados, como los que se hallan en la cola del cangrejo de río o la langosta. Estos músculos presentan sarcómeros cortos, lo que implica contracción rápida, asociada a coletazos casi espasmódicos que permiten al animal huir rápidamente.

En otros casos estudiados, tanto en vertebrados como en invertebrados, la especialización en músculos rápidos y lentos es menos completa que en los ejemplos descritos, teniendo la mayoría distribuciones mixtas de fibras en los músculos. Ya sea que los tipos de fibras están dispuestos en músculos separados, o mezclados, la especialización de los distintos tipos de fibras es una característica funcional importante del músculo.

Métodos de obtención de datos

Una vez conocidos los principios fisiológicos y bioquímicos que diferencian los distintos tipos de fibras, describiremos en que se basan las pruebas histoquímicas, inmunohistoquímicas y electroforéticas que vamos a utilizar en estas prácticas.

Pruebas histoquímicas

Basadas en la formación de precipitados coloreados, visibles a simple vista, y de forma más específica mediante el microscopio óptico. En nuestro caso, el precipitado se forma a partir de un derivado insoluble del azul de paranitrotetrazolio (NBT), el azul de formazán. Este se forma debido a la reducción sufrida por el NBT al aumentar la concentración de NADH + H⁺. En ambas rutas de obtención de ATP que tienen lugar en

las fibras rápidas y lentas, se forma $\text{NADH} + \text{H}^+$ y, por tanto, es lo que acompaña al NBT lo que nos diferenciará entre las deshidrogenasas de uno u otro ciclo metabólico.

- **Menadiona** " **glicerofosfato deshidrogenasa ("GPD)**: Nos permitirá valorar la actividad deshidrogenasa de la GPD de la vía glucolítica. Dará positivo, de forma significativa en las fibras rápidas, con una tasa metabólica glucolítica muy alta.
- **NADH** " **tetrazolio reductasa (NADH"TR)**: Nos permite valorar la actividad deshidrogenasa de la vía respiratoria de los ácidos tricarboxílicos.

Pruebas inmunohistoquímicas

Con este tipo de pruebas, podemos diferenciar los diferentes tipos de fibras, ya que presentan distintos patrones de expresión de las proteínas componentes de la maquinaria contractil. Estos distintos patrones pueden llegar expresar una proteína en un tipo de fibra y no en el otro. La base de la detección es la misma que la que se utiliza en la inmunodetección de los Western"blot, la formación del complejo peroxidasa"antiperoxidasa y la formación de un precipitado visible al añadir los sustratos adecuados.

Por supuesto, utilizamos anticuerpos contra aquellas proteínas que se encuentran únicamente o de forma preferente en un tipo de fibras. Mediante inmunohistoquímica cuantitativa, podemos obtener las cantidades relativas de cualquier proteína para que tengamos un anticuerpo.

Uno de los epitopos más utilizados es la cadena pesada de la miosina, con diferentes isoformas que se expresan de forma diferencial en los diferentes tipos de fibras. Además de las isoformas embrionaria y neonatal, existen cuatro isoformas que se expresan en el músculo esquelético adulto, codificadas, codificadas por otros tantos genes: MHC lenta y MHC rápidas de tipo 2A, 2B y 2X. Hay anticuerpos monoclonales comerciales que reconocen específicamente la miosina lentas (tipo I) y la de fibras rápidas (IIa y IIb) sin dar reacción cruzada con las otras. La troponina T es otra proteína que presenta isoformas y para la que también tenemos un anticuerpo monoclonal para la isoforma rápida. Aún no perteneciendo a la maquinaria contractil, hay proteínas que se expresan de forma diferencial en uno u otro tipo de fibra. Este es el caso de la proteína de estrés o de choque térmico HSP72, mucho más abundante en fibras tipo I que en las de tipo II. Estos antígenos permiten obtener una información preliminar rápida sobre la naturaleza de las fibras que componen el músculo.

	<i>Fibras tipo I</i>	<i>Fibras tipo II</i>
	<i>Lentas</i>	<i>Rápidas</i>
Miosina lenta	+	
Troponina T		+
Miosina rápida		+
HSP72	+	

Actividad diferencial ATPasa de la miosina

Otro de los métodos para diferenciar los distintos tipos de fibras es el utilizar el diferente grado de resistencia a medios ácidos o básicos de las isoformas de miosina.

La resistencia viene condicionada por la asociación de isoformas diferentes, tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras. Estas asociaciones presentan diferentes grados de resistencia a pH ácidos (entre 4 y 4,5) y básico (por encima de 9). Esto nos permite escoger condiciones en las que se inactive/n alguna/s isoforma/s sin que la/s otra/s se vea/n afectada/s.

El cuadro de resistencia de los diferentes isotipos se muestra en la siguiente tabla.

pH de preincubación	Tipo I	Tipo II			IIB	IIC
				IIA		
9,3	"	++	+	+		
4,35	+	"	±	+		
4,2	+	"	"	±		

Como se observa en la tabla, incubando sólo en medio ácido y básico podríamos diferenciar perfectamente los tipos I de los tipos II, ya que a pH 9,3 se inactiva la miosina lenta, quedando activa (aunque con diferente grado) las rápidas. A pH 4,2 quedarían activas las miosina de las fibras lentas inactivándose las de las rápidas. Pero el ensayo puede hacerse más preciso si añadimos otro pH, también ácido, a 4,35 unidades. A esta concentración de protones, se inactivan de forma diferencial las distintas asociaciones de isoformas de miosina de las fibras tipo II (mirar la tabla), pudiendo así llegar a identificarlas uniendo todos los datos.

La visualización de la actividad ATPasa se lleva a cabo mediante una serie de postincubaciones (después de haber estado expuesta al medio extremo). Se trata de activar la contracción añadiendo ATP y Ca^{++} a pH alcalino. En ese momento empieza a funcionar la actividad ATPasa de la cabeza de la miosina (aquella que esté activa), dejando en el medio el resultado bioquímico de la hidrólisis del ATP, ADP + Pi. El fosfato inorgánico, en medio alcalino, se asocia espontáneamente con el calcio para formar fosfato cálcico, sal insoluble que precipita en el lugar donde se ha formado. Añadimos posteriormente una solución de cobalto con el fin de intercambiarlo por el calcio en la sal precipitada. Después de la incubación, se ha formado una nueva sal, también precipitada que podemos transformar en algo visible añadiendo sulfuro amónico. El resultado es un precipitado negro de sulfuro de cobalto (de ahí el círculo de distintos tonos de negro que hemos utilizado en la tabla).

Evidentemente la cantidad de sulfuro de cobalto debe ser la misma, o cuando menos proporcional a la cantidad de Pi existente en el medio, el cual proviene de la actividad ATPasa de la miosina. El resultado es, por tanto, un tono negro más tupido a mayor actividad.

Electroforesis

Hemos estado hablando de diferentes patrones de expresión de proteínas en los distintos tipos de fibras. Esto implica que mediante un gel de electroforesis con SDS podríamos diferenciar dos homogeneizados procedentes de diferentes fibras.

En efecto esto es así, como veremos en el desarrollo de las prácticas. Sin embargo, las conclusiones a sacar se verían ampliadas en electroforesis en condiciones nativas, que permitiría diferenciar mejor las isoformas que difieran en carga, algo más usual que las diferencias de peso molecular, que sería lo que vemos en un gel desnaturizante.

Las proteínas que muestran estas diferencias son, principalmente la Ca^{++} ATPasa, algunas isoformas de la miosina y la presencia de la cadena ligera LC3 exclusivamente en fibras rápidas.

• Desarrollo de la práctica

Para poder efectuar un mayor análisis, repartimos el trabajo entre la mesa. Cada mesa tendrá una misma muestra problema que tendremos que identificar por los métodos señalados en el apartado anterior. Cada pareja realizará un tipo distinto de ensayo, de modo, que al final de las prácticas, la puesta en común de los datos nos permitirá efectuar un veredicto.

Como patrón de fibra rápida, utilizaremos el músculo extensor de los dedos largos, y como patrón de fibras lentas, utilizaremos el músculo soleo, de los que ya hablamos en el apartado anterior.

Para una mejor distribución, todas las mesas seguimos un mismo patrón de ensayos, cada uno de estos grupos consta de una prueba histoquímica, otra inmunohistoquímica, otra de actividad ATPasa de la miosina y otra electroforética. La distribución de los ensayos fue la siguiente:

	<i>Código de ensayo</i>	<i>ATPasa miofibrilar</i>	<i>Histoquímica</i>	<i>Inmunohistoquímica</i>	<i>Electroforesis</i>
Pareja A	C	pH ácido	NADH"TR	Troponina T	
Pareja B	D	pH básico	M" "GPD	Miosina Rápida	
Pareja C	A	pH ácido	NADH"TR	HSP72	
Pareja D	B	pH básico	M" "GPD	Miosina Lenta	

Durante el desarrollo de las prácticas, necesitaremos portas con los cortes de tejido, sobre los que realizaremos los ensayos de la ATPasa e histoquímica. Estos portas contendrán los patrones de fibra rápida EDL y los de fibra lenta, Sol, además de un corte problema que vendrá identificado con un número. El número servirá para saber al final de la práctica si hemos acertado en nuestras conclusiones. Para poder identificar los cortes, una vez colocados sobre el porta tenemos éste esmerilado por uno de los extremos, con lo que podemos disponer los cortes con una disposición relativa que será idéntica para todos los portas que recibiremos. Esta es la siguiente:

Para el ensayo de inmunohistoquímica utilizaremos un porta con el corte del problema, no de los patrones

Desarrollo experimental

Desarrollaremos la metodología a seguir sólo en los ensayos que realizamos, (mostrados en la tabla), aunque, en el apartado de conclusiones mostraremos los resultados de la mesa haciendo un desarrollo de lo que nos permite afirmar cada uno de los ensayos.

En los portas que nos dieron, el problema era el número 10, el mismo para toda la mesa.

Actividad ATPasa miofibrilar

Material

Portaobjetos conteniendo los cortes de los músculos Soleo, EDL y problema. Cubeta de incubación para portas. Baño a 37 °C. Tampón AmMeP"Ca (CaCl₂ 0,1 M; AmMeP 50 mM; NaN₃ 0,1%) pH 9,3. Tampón AmMeP (AmMeP 50 mM; NaN₃ 0,1%) pH 9,3. Agua destilada. Solución de CaCl₂ 1M. ATP 0,2M. Solución de CoCl₂ 150 mM. Sulfuro amónico 0,5%. DPX o Aquamount. Microscopio óptico.

Protocolo

- Dejar descongelar el porta 15 o 20 minutos.
- Incubar con 25 ml de tampón AmMeP"Ca pH 9,3.
- Aclarar con agua destilada.
- Incubar 30 minutos a 37 °C con la mezcla de reacción, (24,5 ml de tampón AmMeP; 250 l de CaCl₂ y 250 l de ATP).
- Aclarar con agua destilada, dejándolo 3 minutos en el último lavado.
- Incubar 10 minutos en 25 ml de CoCl₂.
- Aclarar con agua destilada

- Poner en contacto, el tiempo que sea necesario para visualizar color negro, con la solución de sulfuro amónico. Esto debe realizarse en un recinto aireado, pues se trata de una sustancia tóxica y con un olor muy desagradable.
- Aclarar con agua destilada y dejar secar. Montar el cubre añadiendo DPX o aquamount evitando la formación de burbujas.
- Visualizar al microscopio óptico, preferentemente con el objetivo 10x ya que el color negro es bastante intenso.

Incidencias

Durante la realización del ensayo, hubo una equivocación. Esta consistió en un fallo en la preparación de la solución de ATP, en la que se añadió ADP en lugar del nucleótido trifosfato. No hubo forma de descubrir la equivocación, así que seguimos adelante, hasta el paso 8. En nuestro caso no realizamos este paso ya que algunos compañeros ya lo habían intentado con un resultado negativo. Fue entonces cuando se dieron cuenta del error, con lo que decidimos que el ensayo se repetiría al día siguiente.

En definitiva, lo sucedido nos sirvió como control de la contracción muscular, la cual, como ya hemos indicado en apartados anteriores requiere de calcio (componente que sí se suministró) y ATP, donde se encuentra la energía necesaria para el cambio de conformación de la miosina. Si añadimos ADP en lugar de ATP, lo que hacemos es añadir un producto de la reacción ATPasa que realiza la miosina, no el sustrato que necesita. El resultado es, por tanto, negativo. No hay reacción ATPasa, con lo que el músculo no se contrae.

Decidimos utilizar el porta con resultado negativo para teñir con azul de Coomassie. El resultado nos permitió observar el espacio intercelular y células más teñidas que podrían corresponder a células sanguíneas. La irrigación es mayor en aquellas fibras que requieren oxígeno, las lentas y, por tanto, el músculo soleo presenta más capilares que el EDL. En cuanto al problema, el patrón observado se asemejaba mucho al del músculo soleo.

Menadiona "GPD. Medida de la actividad glucolítica"

Material

Portaobjetos conteniendo los cortes de los músculos Soleo, EDL y problema. Cubeta de incubación para portas. Baño a 37 °C. Tampón Tris 0,2 M, pH 7,4. Menadiona 0,02 M. "glicerofosfato 0,2 M. NBT 2,5%. Agua destilada. DMX o aquamount. Microscopio óptico.

Protocolo

- Dejar descongelar el porta 15 o 20 minutos.
- Incubar a 60 minutos a 37 °C en 25 ml de una solución compuesta por: 2ml de Tris, 1ml de Menadiona, 1ml de "glicerofosfato, 1ml de NBT y agua destilada hasta el volumen final.
- Lavar con agua destilada
- Dejar secar u montar con DPX o aquamount.

Incidencias

Ninguna. El ensayo se desarrolló sin ningún contratiempo. Durante la observación del cubre en el microscopio, se podían observar zonas más oscuras, que no eran consecuencia de la reacción, sino de pequeños pliegues que se formaron al fijar el tejido al porta. Esto ocurrió en todas las muestras, en mayor o menor medida.

Inmunohistoquímica. Ab contra miosina lenta

Material

Porta con corte de tejido problema. Tampón TBS (Tris"Salino"HCl: Tris 0,5 M; NaCl 0,145 M), pH 7,6 M. suero bovino al 10%. Anticuerpo primario (contra las cadenas pesadas de la miosina de fibras de contracción lenta) diluido en TBS y albúmina bovina al 0,1%. Anticuerpo secundario a una dilución 1:25 (contra el primario). Complejo peroxidasa"antiperoxidasa diluido 1:100 en TBS. 4"Cloro, 1"Naphtol diluido en tampón tris. Peróxido de hidrogeno al 0,05%. Placa Petri grande. Papel de filtro, varillas cuadrangulares de cristal. Microscopio óptico.

Protocolo

- Rehidratar las secciones congeladas en tampón TBS, eliminando con mucho cuidado el exceso de tampón de los bordes del tejido, sin tocarlo.
- Incubar 20 minutos con TBS con albúmina de suero bovino.
- Incubar toda la noche 4 °C con el anticuerpo primario.
- Lavar con PBS y secar cuidadosamente.
- Incubar durante 30 minutos con el anticuerpo secundario.
- Lavar cuidadosamente con TBS.
- Incubar con el complejo PAP durante 30 minutos.
- Lavar con PBS
- Desarrollar la reacción de la peroxidasa durante 5 o 10 minutos con cloronaftol y agua oxigenada.
- Lavar con agua destilada y dejar secar.

Incidencias

El ensayo no tuvo contratiempos. Todo se realizó en el interior de una placa Petri a la cual habíamos añadido papel de filtro recortado a medida y empapado para mantener la humedad en el interior. Para que el porta no entre en contacto con el papel de filtro, se utilizan dos varillas cuadrangulares de cristal, que dispuestas paralelamente sirven de soporte al porta.

Electroforesis (SDS"PAGE)

Material

Stock de acrilamida 30 % (29,2 g de acrilamida: 0,8 g de bisacrilamida). Tris-HCl 1M pH 6,8. Tris-HCl 1M. pH 8,8. SDS 10 %. Persulfato amónico (APS) 10 %. TEMED. Tampón de electroforesis (Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,1%; pH 8,3). Tampón de carga 2x (Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8); SDS 4%; glicerol 20 %; 2--mercaptoetanol 10 %; EDTA 15 nM; azul de bromofenol 0,008 %). Marcadores preteñidos de peso molecular. Homogeneizado de músculo soleo, EDL y problema a concentraciones conocidas.

Protocolo

Hacemos un gel mediante un soporte doble. El gel será discontinuo, para empaquetar las proteínas y así asegurarnos que todas parten a la vez. En el gel se cargan los marcadores de peso molecular, el músculo soleo, el EDL y el problema; además de componentes de la otra práctica.

Incidencias

Debido a la experiencia con el tipo de molde con el que fabricamos el gel (los utilizamos en prácticas de otras asignaturas), pudimos evitar que los espacios creados entre los diferentes cristales hicieran (por el principio de los vasos comunicantes) que el frente del gel separador quedara demasiado bajo, lo que implicaría una separación escasa y una baja información.

Hay que decir que los músculos nunca están formados por un solo tipo de fibra, por tanto, en el homogeneizado de soleo también estarán presentes proteínas características de fibras rápidas y viceversa. Sí es cierto que la proporción observada al microscopio es muy baja y que, al ser la detección por Coomassie, de baja resolución, no creemos que esto influya sobremanera en el resultado.

• **Resultados**

En este apartado discutiremos los resultados obtenidos, no solo por nosotros, sino por toda la mesa. El haber dividido el trabajo nos ha hecho posible el realizar un mayor número de pruebas para la posterior identificación.

Histoquímica

Se realizaron dos pruebas metabólicas, una para valorar la glucólisis (M⁺ "GPD) y otra para marcar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (NADH⁺TR).

Menadiona⁺ "GDP

Esta prueba dio positivo (color azul⁺violeta intenso) para la mayoría de al células del músculo EDL pero, sin embargo, las fibras del músculo soleo y del problema presentaban una coloración más débil, que se distinguía a simple vista.

Se pone de manifiesto que no hay músculos compuestos por un solo tipo de fibras, ya que en el músculo soleo y en el problema aparecían fibras glucolíticas rápidas y en el EDL fibras sin tinción correspondientes a fibras lentas.

NADH⁺Tetrazolio reductasa

Al contrario que la anterior, este ensayo marca la actividad respiratoria, que se lleva a cabo en la mitocondria. Ya que utilizan el mismo sistema de marcado (mismo precipitado) el positivo es igual que con la menadiona, un color azul⁺violeta intenso. En este caso, y como indica la lógica el resultado fue el contrario al del ensayo anterior, positivo en el corte de músculo soleo y el problema y negativo en el corte de EDL.

Sección de músculo esquelético: NADH⁺TR. El círculo de la derecha muestra partes de los dos tipos de fibras con un mayor aumento. Los componentes contráctiles no se tiñen. Foto tomada del atlas de histología. Ross

El resultado al microscopio se observa en la siguiente micrografía. No es un músculo especializado, sino que presenta un mosaicismo característico de la mayoría de los músculos estriados.

Sección de músculo esquelético: Succinico Deshidrogenasa x 200. histología funcional, Wheeler.

La detección de actividades metabólicas tienen su dificultad en las fibras ROG (rápidas oxidativas⁺glucolíticas), ya que presentarían positivos más o menos tenues en ambos ensayos.

Hay otros tipos de marcados metabólicos, como el que se muestra en la figura. En este caso se trata del ensayo histoquímico de la succínico deshidrogenasa, enzima de la vía respiratoria. **A** fibras aerobias (LO); **An** fibras anaerobias (RG); **I** fibras intermedias (ROG). En esta micrografía se observa perfectamente el mosaicismo existente en la mayoría de los músculos, no solo de mamíferos.

Inmunohistoquímica

En este caso, tenemos tres anticuerpos monoclonales que nos marcarán proteínas que solo se expresan en un tipo de fibra.

El positivo puede presentarse de forma muy tenue, con lo que hay que tener cuidado con el fondo. En principio, si hay color, es que en la muestra se encuentra la proteína contra la que se ha lanzado el anticuerpo. Todos los positivos presentarán el mismo color, aunque la intensidad será variable, en función de la cantidad de la proteína blanco que halla en la muestra.

HSP72

Se observa una leve coloración, pero no parece un positivo claro. Pudiera ser, que al tratarse de una proteína citosólica, nos la hubiéramos llevado con los lavados. Si que aparece más intenso en el espacio entre las fibras.

Cadena pesada de la miosina de las fibras lentas

El resultado es positivo, como es lógico a tenor de las pruebas que ya poseemos. Se ven zonas no teñidas, correspondientes a las fibras rápidas intercaladas dando lugar al mosaicismo ya descrito.

Troponina T

No se observa coloración en la mayoría del corte, sólo algunas fibras, que ahora podemos calificar de rápidas, muestran un ligero color.

Cadena pesada de la miosina de las fibras rápidas

Evidentemente el resultado es negativo en la mayoría del corte, si exceptuamos a las fibras rápidas que están presentes de forma mínima en las demás muestras nº 10, pero que en esta parece haber coincidido con una zona más heterogénea.

ATPasa miofibrilar

En esta prueba sólo realizamos dos ensayos a pH ácido de 4,3 y otra básico de 9,3. La irreproducibilidad de los ensayos hace poco eficiente la comparación de tonos a pH intermedio de 4,5, lo que nos permitiría la identificación de las fibras rápidas IIA, IIB Y IIC.

pH ácido(4.3)

La isomiosina del músculo EDL, un resiste el tratamiento ácido, de modo que se forma poco Pi. El resultado es, la no coloración del corte, si exceptuamos algunas fibras lentas que se intercalan en el músculo. En el corte de músculo soleo, la diferencia es notable. Presenta un color oscuro, resultado de la precipitación del sulfuro de cobalto, lo que significa una actividad ATPasa, a pesar del tratamiento ácido, propio de fibras lentas.

En cuanto al problema, presenta una tinción oscura similar a la que presenta el músculo soleo.

pH básico (9.3)

Dijimos que en medio básico, eran las isomiosinas de las fibras lentas las que no resistían. Esto se pone de manifiesto en el músculo soleo, que presenta cierta actividad, mostrada por un tono oscuro, tal vez resultado de un pH no muy extremo o por un defecto en la realización del ensayo (poco tiempo en el medio básico, mucho tiempo en el medio de reacción o en el sulfuro amónico) que ha podido aumentar el fondo. Como es de esperar hay zonas del corte que presentan coloración más intensa.

El músculo EDL presenta un tono muy oscuro, casi negro, lo que lo caracteriza como músculo rápido. Al microscopio se observan fibras con una tinción de menor intensidad.

El problema tiene un tono oscuro, al igual que el músculo soleo.

Sección de músculo esquelético ATP-asa x 600. histología funcional, *Wheater*.

En la micrografía presentada a la derecha se observa un corte de músculo esquelético. Como la mayoría es heterogéneo, algo que se pone de manifiesto también mediante esta prueba. **A** fibras aerobias (LO); **An** fibras anaerobias (RG); **I** fibras intermedias (ROG).

Electroforesis

Como ya dijimos en el apartado anterior, las conclusiones que se pueden sacar de un gel SDS-PAGE son limitadas. Prácticamente sólo te permiten diferenciar patrones de expresión.

En ese límite, podemos afirmar que el patrón de expresión de nuestro problema se asemeja mucho al del músculo soleo, incluso podríamos decir que es el mismo. Esto se observa claramente en la fotografía del gel.

Aún sin identificar proteínas, es evidente que las fibras rápidas presentan proteínas que no están en las lentas. En este orden, deberíamos observar como, proteínas como la Troponina T y la cadena ligera de la miosina LC3, sólo se expresan en fibras rápidas, mientras que HSP72 sólo se expresa en fibras lentas. No podemos identificar la mayoría de los isotipos, ya que tienen el mismo peso molecular. Tampoco podemos hacer mucho caso a diferencias de tonalidad de las bandas, ya que la cantidad de proteína que hemos añadido en el pocillo puede ser distinta aunque en la célula sea la misma.

Identificación de Proteínas

Mediante la construcción de una recta patrón intentaremos identificar la mayor cantidad de bandas posible. Como ya dijimos, el pequeño tamaño del gel, el hecho de estar en condiciones desnaturalizantes y el utilizar un método de revelado poco sensible como el Coomassie, hace extremadamente complicado llegar a identificar las proteínas de forma clara.

	Pm (Da)	Log Pm	(cm)
1	180.000	5,255	0,5
2	116.000	5,061	1
3	84.000	4,924	1,35
4	58.000	4,763	1,75
5	48.000	4,681	2,2
6	36.000	4,556	2,9
7	26.000	4,415	3,4

En la representación marcamos ya los pesos moleculares calculados de las bandas de las que se tomo la movilidad electroforética. Como observación hay que decir que todos los datos de se tomaron sobre el gel sin deshidratar.

En la representación se observa como la desviación de los puntos marca dos rectas con pendientes distintas. Aunque lo preceptivo es realizar una recta de regresión, y luego interpolar, el hecho de que las bandas a interpolar caigan sobre dos rectas de ajuste perfecto a los puntos, nos ha hecho pensar que daría un resultado más exacto de Pm que la interpolación sobre la recta de regresión. Esto se demuestra en la primera banda, = 0,5 cm, en la que interpolando sobre la recta, llamémosla experimental, se obtiene un Pm de 180.000 Da, que

coincide exactamente con la primera banda del patrón, que presenta la misma movilidad electroforética. Sin embargo, la interpolación sobre la recta de regresión arroja un dato de 160.000 Da, lo que no está mal, pero es evidente que en este caso se ajustaría más a la realidad el peso obtenido sobre la recta experimental que el obtenido sobre la recta de regresión.

Para intentar minimizar el error, hemos creído conveniente obtener los Pm mediante el *antilogaritmo* de la media, del resultado obtenido de la interpolación en las dos rectas. O lo que es lo mismo, interpolaremos sobre las dos rectas, y haremos la media del *logaritmo* del Pm, con ese valor realizamos el *antilogaritmo* obteniendo el valor de Pm. Esto se realizará siempre y cuando, los dos puntos se encuentren cercanos. En los casos en los que los puntos resultado de una misma interpolación se encuentren ostensiblemente separados, hemos optado por calcular los Pm resultantes de cada punto, como se muestra en la gráfica.

Los resultados se muestran en la gráfica, pero ahora los volvemos a mostrar intentando identificar proteínas. Para la identificación, necesitamos los Pm de las proteínas musculares, o la información que se nos dio en prácticas, donde se nos indicó cual era la banda de la $\text{Ca}^{++}\text{ATPasa}$. Los datos recopilados de Pm se muestran en esta tabla.

Proteína		Pm (Da)	
Miosina	Cadena Pesada	220.000	22.000
	Cadenas Ligeras		
	LC1, LC2, LC3		
Actina		43.000	
Tropomiosina		32.000	
Troponina	Tn''T	30.000	
	Tn''I	30.000	30.000
	Tn''C	18.000	18.000

El resultado de la identificación lo mostramos mediante este cuadro.

En esta identificación hay patrones que no parecen encajar en exceso. Esto puede ser por una error en la identificación o por una mala visualización de las bandas. Las bases de la identificación han sido las siguientes.

- **Miosina.** Aún presentando un Pm bajo. Efectivamente, el peso de la miosina es de 220.000 Da, mientras que la proteína identificada en el gel presenta un Pm de 180.000. Esto puede ser debido al variable tamaño de la miosina. En todo caso, no puede ser otra proteína, ya que la gran mancha indica una gran cantidad de proteína, y la miosina, junto a la actina son las mayoritarias en el músculo.
- **$\text{Ca}^{++}\text{ATPasa}$.** Hemos podido identificar esta proteína gracias a la intervención del profesor de prácticas, ya que no hemos podido encontrar su Pm. La descripción de isoformas rápidas es evidente al observar el resultado del gel. Las fibras rápidas presentan una bomba diferente, que debe ser capaz de trasladar los iones calcio al retículo sarcoplásmico de una forma más rápida que la presente en las lentas. Esta diferencia es una de las bases claves en la discriminación de tipos de fibras.
- **Actina.** Casi sorprendentemente, el peso molecular encaja perfectamente. Además, como pasaba con la miosina, la intensidad de la banda no deja otra posibilidad.
- **Tropomiosina.** Al igual que con la actina, el Pm encaja. La expresión de esta proteína es la misma en todos los tipos de fibras. El menor grosor de la banda en el músculo EDL nos hace pensar que se introdujo menos cantidad de muestra. Esto se corrobora con bandas como la de la actina o la miosina.
- **Troponina T y Troponina I.** El peso molecular de la banda la hace la mejor candidata para pertenecer a estas proteínas. En cuanto al patrón de expresión. La mayor intensidad de la banda del músculo EDL, podría corresponder a una mayor expresión de alguna o de las dos en las fibras rápidas. Lo que sí está claro

es que, la Tn^T presenta isoformas diferentes, como ya vimos en la prueba inmunohistoquímica.

- **Cadenas ligeras de la miosina.** La identificación de estas bandas ha sido extremadamente complicada, y se podría decir que es casi aleatoria. En cuanto al patrón de expresión conocido, hay que decir que LC3, sólo se encuentra en las fibras rápidas, pero que estas expresan también LC1 y LC2, aunque en proporciones diferentes que en las fibras lentas. Hemos optado por esa colocación de bandas, porque sí que parece existir una leve banda a la altura de la identificada para LC1 y LC2 en músculo EDL y, sin embargo, no hay proteína a la altura de la banda identificada con LC3 para fibras lentas. También es cierto que en principio no hemos encontrado diferencias de Pm entre las tres isoformas en ningún libro, pero la explicación dada anteriormente parece coherente.
- **Troponina C.** La adjudicación de esta banda se ha realizado por encajar esta con el Pm de la proteína. La práctica ausencia de banda en músculo EDL, pudiera deberse a la menor carga de muestra en el carril del músculo rápido. Esta banda puede corresponder a la parvalbúmina, proteína que presentar una banda muy cercana al frente.

Identificación del problema

Mediante una tabla intentaremos unificar de forma sencilla todos los resultados expuestos de forma amplia en los apartados anteriores.

Prueba	Ensayo	Soleo	EDL	Problema
histoquímica	M ⁺ "GPD			
		NADH ⁺ TR		
	inmunohistoquímica	Miosina Lenta		
		Miosina Rápida		
		Tn ^T Rápida		
		HSP72		

Prueba	Ensayo	Soleo	EDL	Problema
ATPasa	pH ácido			
		pH básico		
	Electroforesis	Patrón Rápido		
		Patrón Lento		

A la vista de todas las pruebas reunidas durante las prácticas, englobadas en esta tabla, nuestro problema presenta exactamente el mismo comportamiento que el músculo soleo, el cual utilizamos como modelo de fibras lentas (tipo I), al tener éste un alto contenido en este tipo de fibras. Por lo tanto, podemos concluir que:

El problema N° 10 se trata de un corte de músculo con un alto porcentaje de fibras tipo I (LO).

En cuanto a si se trata del propio músculo soleo, podría decirse que sí. La base de este razonamiento es el examen morfológico del contorno del corte, que era prácticamente igual en la muestra de músculo soleo que en el problema. Esto hace pensar que se trataba de cortes seriados.

2"amino, 2"metil, 1"propanol

Paso que no se realizó por problemas de tiempo

Al igual que en el ensayo anterior, no montamos el cubre. En este porque no hacía falta, la visualización es suficiente sin cubre.

Prácticas de Fisiología Molecular

1

26

Tipos de fibras musculares

Ca⁺⁺

ATP

Cabezas de Miosina

Cola de Miosina

Disco

Z

Filamentos de Actina

Línea M

Banda A

Banda H

Banda I

Banda I

Contracción

"

+

Polaridad de los filamentos de actina

EDL

Sol

Prob

Prob

Sol

EDL

Prob

Sol

EDL

Prob

Sol

EDL

Prob

Sol

EDL

4,1

3,9

4,3

1,15

1,1

1,2

2,5

2,8

3

3,2

0,5

Soleo EDL Problema (cm) Pm (Da) Proteína Candidata

20.000 " 15.000

22.000 " 17.000

18.000 " 13.000

102.000

105.000

97.000

43.000

36.000

32.000

30.000 " 27.000

180.000 " 160.000

¿LC3?

¿LC1 y LC2?

¿Tn" C?

Ca⁺⁺ATPasa

Ca⁺⁺ATPasa

Ca⁺⁺ATPasa

Isoformas rápidas

Actina

¿LC1 y LC2?

Tropomiosina

Tn" T y Tn" I

Miosina