

**TRANSITORIOS DE Ca^{2+} DE FIBRAS DE *FLEXOR DIGITORUM BREVIS*
Y *SOLEUS* DE RATÓN DISOCIADOS ENZIMÁTICAMENTE: ¿LAS
DIFERENCIAS CINÉTICAS PODRÍAN ASOCIARSE CON DIFERENTES
TIPOS DE FIBRAS?**

**Ca^{2+} TRANSIENTS FROM ENZYMATICALLY DISSOCIATED MURINE
FLEXOR DIGITORUM BREVIS AND *SOLEUS* FIBERS: ARE KINETIC
DIFFERENCES ASSOCIATED WITH DIFFERENT FIBER TYPES?**

Juan C. Calderón^{1,2}, Pura Bolaños¹, Carlo Caputo¹

RESUMEN

Se utilizaron fibras de *flexor digitorum brevis* (FDB) y *Soleus* de ratón disociadas enzimáticamente para comparar los transitorios de Ca^{2+} de las fibras tipos I, IIA y IIX/D cargadas con el colorante fluorescente MagFluo4-AM, de gran rapidez de respuesta. En el FDB se encontraron dos morfologías diferentes de transitorios, denominadas tipo I (MT-I) y tipo II (MT-II). Los parámetros cinéticos de los transitorios simples MT-I (13 fibras, 21%) y MT-II (50 fibras, 79%) fueron: amplitud ($\Delta F/F$): $0,41 \pm 0,05$ vs. $0,71 \pm 0,03$; tiempo de ascenso (ms): $1,41 \pm 0,13$ vs. $1,0 \pm 0,02$; ancho medio (ms): $10 \pm 0,82$ vs. $3,88 \pm 0,11$; tiempo de caída (ms): $43,8 \pm 2,32$ vs. $21,2 \pm 0,85$; y constantes de caída (t_1 y t_2 , ms): $2,58 \pm 0,18$ y $31,42 \pm 2,48$ vs. $1,5 \pm 0,05$ y $13,24 \pm 0,6$, respectivamente; todas las diferencias fueron estadísticamente significativas. En el *Soleus* todos los transitorios fueron MT-I ($n=21$) y sus parámetros cinéticos fueron similares a los clasificados MT-I de FDB, excepto el ancho medio y el tiempo de caída. Los tétanos MT-I mostraron una forma de escalera y su caída ajustó con una exponencial, mientras que los MT-II no mostraron esta forma y su caída ajustó con una doble exponencial. Experimentos preliminares sugieren una relación directa entre la morfología de los transitorios y los tipos de miosina determinados con anticuerpos monoclonales y electroforesis. Estos resultados sugieren que las señales MT-I provienen de fibras tipo I y IIA mientras las MT-II corresponden a fibras tipo IIX/D y pueden proporcionar un criterio de identificación de los tipos de fibras vivas en músculos esqueléticos. (FONACIT G-2001000637 y G-2005000372).

ABSTRACT

Enzymatically dissociated *flexor digitorum brevis* (FDB) and *Soleus* fibers from mouse were used to compare the kinetics of electrically elicited Ca^{2+} transients of fiber types I, IIA and IIX/D, using the fast Ca^{2+} dye MagFluo4-AM. For FDB two Ca^{2+} transient morphologies, types I (MT-I, 13 fibers, 21%) and II (MT-II, 50 fibers, 79%) were found. The kinetic parameters being: amplitude ($\Delta F/F$): $0,41 \pm 0,05$ vs. $0,71 \pm 0,03$; rise time (ms): $1,41 \pm 0,13$ vs. $1,0 \pm 0,02$; half width (ms): $10 \pm 0,82$ vs. $3,88 \pm 0,11$; decay time (ms): $43,8 \pm 2,32$ vs. $21,2 \pm 0,85$; and time constants of decay (t_1 y t_2 , ms): $2,58 \pm 0,18$ and $31,42 \pm 2,48$ vs. $1,5 \pm 0,05$ and $13,24 \pm 0,6$, respectively; all comparisons being statistically different. For *Soleus* ($n=21$) only MT-I was found, with similar characteristics to MT-I from FDB, except for the half width and decay time. Tetanic transients MT-I showed a staircase shape and the decay was fitted with one exponential, while MT-II did not show this shape and the

¹Laboratorio de Fisiología Celular, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela. ²Departamento de Fisiología y Bioquímica, Grupo de Fisiología del Ejercicio, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

decay was fitted with two exponentials. Preliminary experiments show a direct relationship between transient morphology and myosin type present in the fibers as determined using monoclonal antibodies and electrophoretic procedures. The results suggest that signals classified as MT-I may correspond to fibers types I and IIA while those classified as MT-II may correspond to fibers IIX/D. (FONACIT G-2001000637 y G-2005000372).

Palabras clave: tipos de fibras, transitorios de Ca^{2+} , *Flexor Digitorum Brevis*, *Soleus*, miosina.

Keywords: fiber types, calcium transients, *Flexor Digitorum Brevis*, *Soleus*, myosin.

INTRODUCCIÓN

Los diferentes músculos esqueléticos tienen diferentes propiedades contráctiles. Ranvier describió algunas características de los músculos rojos y blancos hace ya más de un siglo (Ranvier, 1873), y en las últimas décadas se ha acumulado información sobre algunas de estas diferencias (revisado en Close 1972 y Bottinelli & Reggiani 2000). Estas diferencias se explican por la diferente proporción de tipos de fibras existente en cada músculo. Los músculos esqueléticos, en general, no son homogéneos, están constituidos básicamente por 4 tipos de fibras denominadas puras: las tipo I, IIA, IIX/D y IIB y por fibras híbridas, las cuales contienen al menos dos tipos de miosinas. La actual metodología de clasificación se basa en el tipo de cadena pesada de miosina presente en cada fibra muscular, este método deriva de la depuración de los diferentes métodos establecidos durante los últimos 50 años, basados principalmente en la presencia y actividad de diferentes proteínas y enzimas y en las propiedades contráctiles como la velocidad de contracción y relajación de cada fibra (Dubowitz & Pearce, 1960; Stein & Padykula 1962; Engel 1962; Guth & Samaha 1969; Brooke & Kaiser, 1970; Barnard *et al.*, 1971; Burke *et al.*, 1971; Peter *et al.*, 1972).

Gran parte de la información que se ha acumulado sobre fisiología muscular deriva de músculos heterogéneos y en algunos casos no se puede demostrar qué tipo de fibra se está utilizando en un experimento dado. En los experimentos en los cuales se utilizan fibras disociadas

enzimáticamente los resultados no han sido relacionados con un tipo de fibra particular (Bekoff & Betz, 1977; Carroll *et al.*, 1995; Capote *et al.*, 2005; Bolaños *et al.*, 2008) y los trabajos que pretenden estudiar las diferencias entre los tipos de fibras lentas y rápidas (I vs II) no consiguen demostrar inequívocamente con qué tipo de fibra se han hecho, pues han utilizado músculos que son heterogéneos (Eusebi *et al.*, 1980; Carroll *et al.*, 1997; Baylor & Hollingworth, 2003). En experimentos en los cuales se ha estudiado el fenómeno de fatiga muscular no se demostró la identidad de las fibras utilizadas (Westerblad & Allen, 1991; Allen *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 1998).

De igual forma, debido a las dificultades técnicas, hasta hoy no ha sido posible estudiar la fisiología de una fibra muscular conociendo *a priori* a cuál tipo pertenece y la determinación *a posteriori* del tipo de fibra utilizada en un experimento es dispendiosa, tampoco ha sido posible describir claramente un patrón para la cinética de los transitorios de Ca^{2+} según el tipo de fibra, por lo cual se justifica el desarrollo de una técnica de clasificación de fibras musculares desde el punto de vista fisiológico, la cual permita conservar la fibra viva para futuros experimentos. Los transitorios de calcio reflejan el movimiento de salida de Ca^{2+} hacia el sarcoplasma y recaptura hacia el retículo sarcoplásmico (Caputo, 2001; Calderón-Vélez & Figueroa-Gordon 2009) y como hay diferencias cinéticas en las actividades de las proteínas involucradas en estos flujos de Ca^{2+} , hemos planteado la hipótesis de que debe existir un patrón de transitorios de Ca^{2+} según el tipo de fibra.

El presente trabajo tiene dos objetivos principales: i) presentar un cuadro general de la cinética de los transitorios de Ca²⁺ en los 3 tipos de fibras presentes en los músculos *Flexor digitorum brevis* (FDB) y *Soleus* de ratón adulto disociados enzimáticamente: I, IIA y IIX/D, y ii) estandarizar una metodología que permita clasificar las fibras musculares esqueléticas vivas de acuerdo a la cinética del transitorio de Ca²⁺. Parte de este trabajo fue presentado como resumen recientemente (Calderón-Vélez *et al.*, 2009).

METODOLOGÍA

Preparación de las fibras

El método de disociación enzimática se basó en el descrito por Bekoff & Betz (1977) y modificado por Capote *et al.*, (2005). Ratones NMRI-IVIC de 42-49 días fueron sacrificados por dislocación cervical, se disecaron el FDB y el *Soleus* y se incubaron en una solución, respectivamente, de 3 ó 2,5 mg/ml de colagenasa, por 60 min a 36,8°C. Después se lavaron los músculos y se disociaron con la ayuda de pipetas Pasteur de vidrio con la punta previamente pulida con fuego.

Transitorios de Ca²⁺

Las fibras disociadas se transfirieron a una cámara experimental donde se cargaron pasivamente con el indicador MagFluo4-AM 10 ¼M (Molecular Probes) por 30-35 minutos. Para evitar artefactos de movimiento las fibras se pusieron sobre un cubreobjetos previamente cubierto con 2 ¼l Laminina (Sigma, 1 mg/ml). Una vez cargadas fueron lavadas y la cámara se montó en un microscopio de fluorescencia. Las células fueron estimuladas eléctricamente (1 ms de duración para las sacudidas simples y a una frecuencia de 100 Hz durante 250-350 ms para los tétanos) mediante electrodos que corren paralelos a ambos lados de la cámara. Algunas fibras fueron evaluadas bajo el efecto de 20-30 ¼M de N-bencil-p-tolueno sulfonamida (BTS, *Toronto Research Chemicals, Canada*). Los registros

fueron obtenidos, guardados y analizados utilizando el programa pClamp 6. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (21-23°C).

Inmunomarcaje de fibras disociadas

A algunas fibras a las cuales se les evaluó el transitorio de Ca²⁺ se les determinó el tipo de miosina presente por inmunofluorescencia. Se utilizaron los anticuerpos antimiosina rápida My-32 (Sigma) y antimiosina IIA SC-71 (derivado del cultivo del hibridoma HB-277, de ATCC). Cuando las fibras se marcaron con My-32 se fijaron en paraformaldehído y cuando se utilizó el anticuerpo SC-71 se fijaron en acetona a -20°C. Los procedimientos de permeabilización con Triton X-100 0,7%, bloqueo con albúmina bovina, marcateje con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen) y montaje en Mowiol (Calbiochem) fueron similares para todas las células. En todos los casos se hicieron controles en los cuales no se utilizaron anticuerpos primarios.

Las muestras fueron observadas en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000, equipado con un sistema láser confocal Nikon C1 (Nikon Co., Tokyo, Japan), con láseres de Neón (543 nm) y Argón (488 nm). Las imágenes fueron adquiridas y procesadas con los programas EZ-C1 Viewer 2.1 (Nikon Co., Tokyo, Japan) e Image J 1.37v (*National Institutes of Health, USA*).

Determinación de tipos de cadena pesada de miosina (MHC) por electroforesis

A varias fibras a las cuales se les evaluó el transitorio de Ca²⁺ también se les determinó el tipo de miosina presente por electroforesis en poliacrilamida. Una vez registrado el transitorio la fibra fue puesta en 35 ¼l de una solución con 2-mercaptoetanol, dodecilsulfato de sodio, glicerol, azul de bromofenol y agua, luego fue sonicada por un minuto (*Sonic dismembrator, Fisher Scientific Inc., USA*) y sometida a electroforesis.

Como patrones se utilizaron el FDB y el *Soleus*, los cuales se homogenizaron, centrifu-

garon y trataron como se ha descrito para obtener miofibrillas purificadas (Sartorius *et al.*, 1998).

Tanto las miofibrillas purificadas como las fibras aisladas se sometieron a electroforesis (SDS-PAGE) al 8% con glicerol según lo descrito previamente (Talmadge & Roy, 1993) por 28 horas a 4°C. Los geles se tiñeron con nitrato de plata.

Estadística

Las diferencias estadísticas entre las medias fueron calculadas usando la prueba *t* de Student para poblaciones independientes, con ayuda del programa Origin 7.5 (Microcal Software Inc., USA) y se expresaron como la media ± error estándar de la media. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con $P < 0,05$.

RESULTADOS

Morfología de las fibras de FDB y Soleus disociadas

A pesar de que la disociación enzimática de músculos fue publicada por primera vez hace más de 30 años (Bekoff & Betz, 1977), la gran mayoría de los trabajos han utilizado músculos cortos, como el FDB u otros músculos de las patas de ratones. En este trabajo presentamos resultados con fibras de *Soleus* disociadas. La figura 1 muestra las principales características morfológicas del *Soleus* en comparación con el FDB. Llama la atención que las fibras de *Soleus*, a pesar de ser cerca de 8 veces más largas ($3,95 \pm 0,13$ mm, $n=32$ vs. $0,520 \pm 0,006$ mm, $n=79$, $P < 0,05$), son levemente más anchas que las del FDB ($39,43 \pm 1,42$ μ m, $n=32$ vs. $35,05 \pm 1,03$ μ m, $n=79$, $P < 0,05$).

Transitorios de Ca^{2+} de fibras de FDB y Soleus

Se evaluaron los transitorios de Ca^{2+} de 63 fibras de FDB disociadas enzimáticamente y se encontraron dos morfologías que denominamos: tipo I

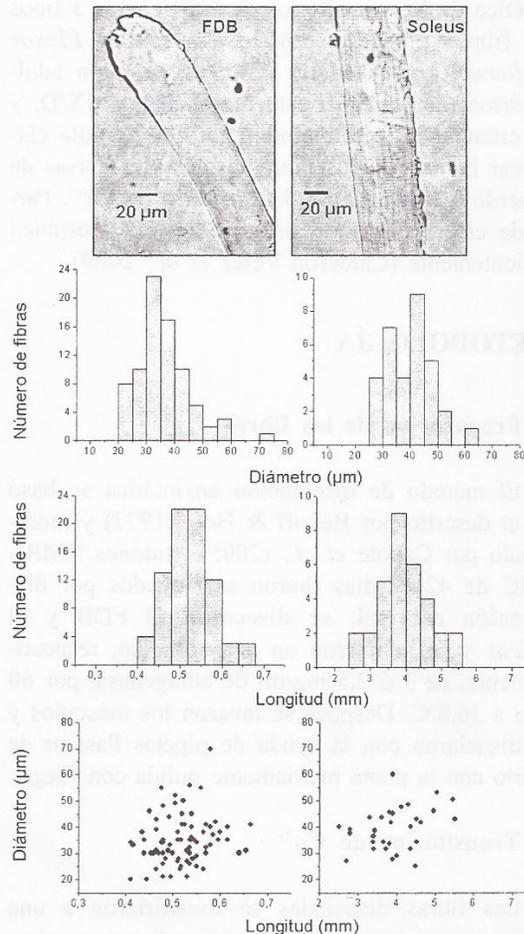


Figura 1. Características morfológicas de las fibras de FDB (columna izquierda, $n=79$) y *Soleus* (columna derecha, $n=32$) de ratón disociadas enzimáticamente. La parte superior muestra imágenes de una fibra de FDB (izquierda) y otra de *Soleus* (derecha). Se observa el patrón de bandas típico del músculo esquelético. En la parte central se muestran los histogramas de distribución del diámetro y la longitud de las fibras. En la parte inferior se observa que no hay correlación entre el diámetro y el largo de las fibras.

en el 20,6% de las fibras ($n=13$), mientras que el MT-II se encontró en el restante 79,4% ($n=50$). Los transitorios simples clasificados MT-I fueron

de menor amplitud y más lentos, tanto para las variables de liberación como para las de remoción de Ca²⁺, que los MT-II. Los transitorios tetánicos MT-I mostraron un patrón en el cual el segundo y subsecuentes picos de la señal son iguales o mayores que el primero, generándose una forma de escalera, lo cual los diferencia de la MT-II, en la cual el segundo y subsecuentes picos de la señal fueron siempre menores que el primero (figura 2). La cinética de los transitorios de la subpoblación MT-I fue significativamente más lenta que la de la subpoblación MT-II (tabla 1).

Ante la posibilidad de que la MT-I se relacionara con fibras lentas tipo I y la morfología MT-II lo hiciera con las fibras rápidas tipo II, evaluamos los transitorios de 21 fibras de *Soleus* disociadas enzimáticamente. En todas las fibras de *Soleus* evaluadas se encontró la MT-I. La cinética de estos transitorios fue similar a las MT-I de FDB pero significativamente más lenta que las MT-II de FDB (tabla 1). El hecho de que sólo apareciera la MT-I en las fibras de *Soleus* nos llevó a pensar que dicha morfología era compartida tanto por las fibras lentas tipo I como por las fibras IIA (véase más adelante).

Relación de los transitorios de Ca²⁺ con los tipos de fibras

Se utilizaron varias estrategias para determinar si los transitorios de Ca²⁺ se relacionaban con algún tipo de fibra en los músculos estudiados. i) Tres fibras de FDB cuyos transitorios fueron del tipo MT-II fueron evaluadas con anticuerpos contra la miosina rápida (My-32) y en los 3 casos el marcaje fue positivo (figura 3). Dos fibras de FDB en las cuales se encontraron transitorios MT-I fueron positivas cuando fueron evaluadas con un anticuerpo contra la miosina tipo IIA (no se muestran). ii) Siete fibras de FDB y 3 de *Soleus* fueron evaluadas bajo el efecto de BTS a concentraciones que inhiben la contracción de las fibras rápidas pero no (o mínimamente) la de las fibras lentas (Cheung *et al.*, 2002). Estos experimentos nos permiten diferenciar las fibras tipo I de las II y demostrar que las diferencias entre las morfologías no son debidas a artefactos de movimiento. En todos los casos (5 fibras de FDB) clasificados como MT-II las fibras fueron afectadas por el BTS, pero sólo dos de las fibras con transitorios clasificados MT-I (ambas de FDB) lo fueron. La contracción de las tres fibras

Tabla 1. Principales parámetros cinéticos de los transitorios de Ca²⁺ de las fibras de FDB y *Soleus* de ratones adultos^a

Músculo	n	ΔF/F	Ascenso 10-90% (ms)	Ancho medio (ms)	Tiempo de caída (ms)	Constantes de caída (ms)	
						τ ₁	τ ₂
FDB MT-I*	13	0,41±0,05	1,41±0,13	10±0,82	43,8±2,32	2,58±0,18	31,42±2,48
FDB MT-II**	50	0,71±0,03	1,0±0,02	3,88±0,11	21,2±0,85	1,5±0,05	13,24±0,6
Soleus***	21	0,42±0,02	1,58±0,08	12,46±0,78	52,6±2,71	2,86±0,14	36,31±2,01

Los valores son medias ± error estándar. ^aMT-I: morfología tipo I, MT-II: morfología tipo II. *FDB MT-I vs. MT-II $P < 0,001$ para todas las comparaciones (i.e. ΔF/F de FDB MT-I comparado con ΔF/F de FDB MT-II, etc.). **FDB MT-II vs. Soleus $P < 0,001$ para todas las comparaciones (i.e. ΔF/F de FDB MT-II comparado con ΔF/F de *Soleus*, etc.). ****Soleus* vs. FDB MT-I $P > 0,05$ para las comparaciones entre ΔF/F, ascenso y las dos constantes de caída, $P < 0,05$ para el ancho medio y el tiempo de caída.

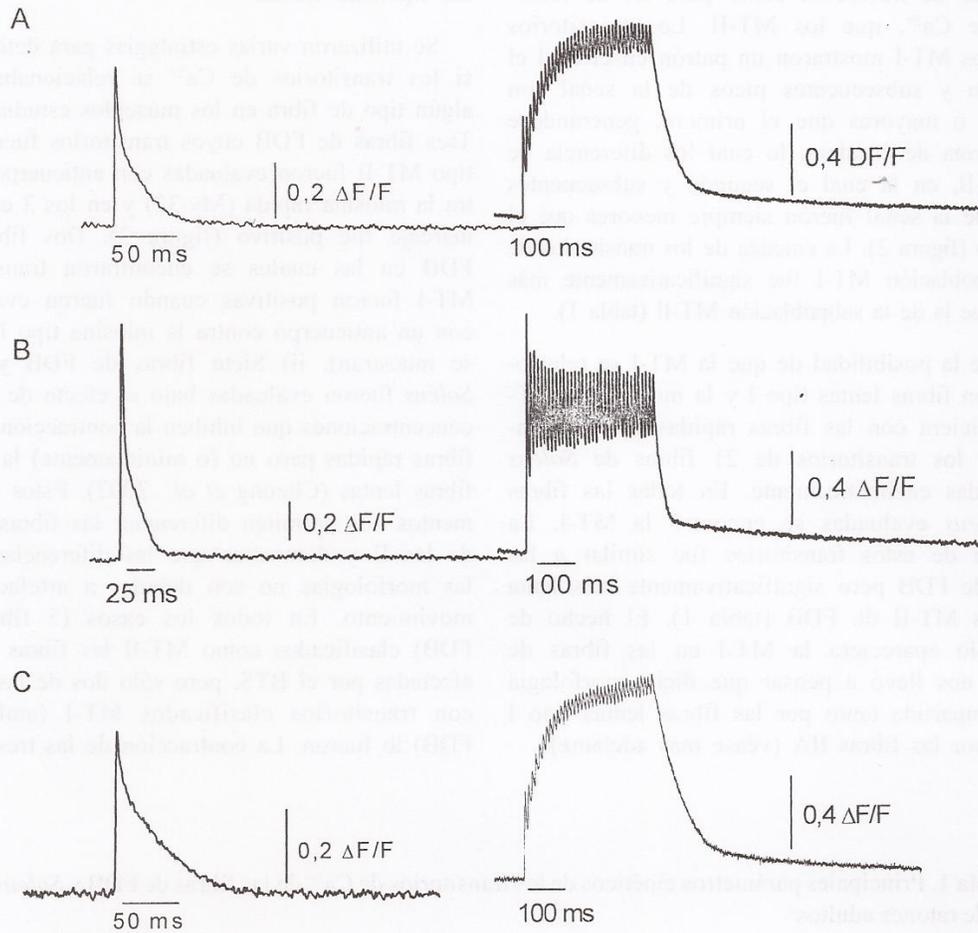


Figura 2. Morfología de los transitorios de Ca^{2+} simples (columna izquierda) y tetánicos (columna derecha) de fibras disociadas de FDB (A y B) y *Soleus* (C) de ratones adultos, obtenidos con MagFluo4-AM. A y C ilustran la morfología tipo I (MT-I), con transitorios anchos y tétanos en forma de escalera, mientras que los registros en B ilustran la morfología tipo II (MT-II), con transitorios estrechos y tétanos en los cuales el primer pico es claramente mayor que los demás. En el *Soleus* no se observó la MT-II. Los registros en C provienen de dos fibras diferentes, los pares de registros A y B provienen de la misma fibra.

restantes clasificadas MT-I (de *Soleus*) no fue inhibida por el BTS (no se muestran). iii) Una fibra de FDB clasificada MT-II y dos fibras de *Soleus* (MT-I) fueron sometidas a electroforesis

para la determinación del tipo de miosina presente en cada una y encontramos que la fibra MT-II es tipo IIX/D, una de las fibras de *Soleus* es tipo IIA y la restante es tipo I.

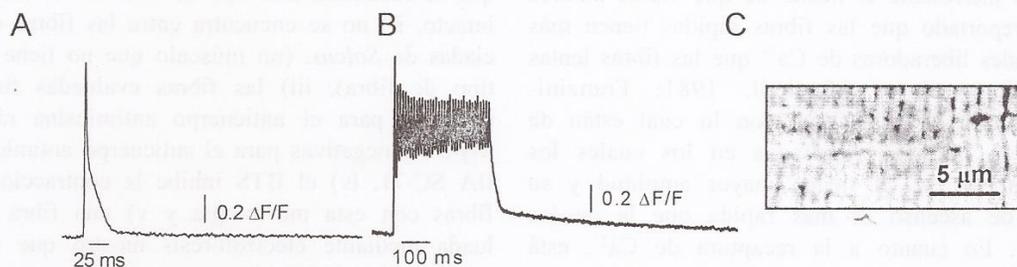


Figura 3. Fibra de FDB clasificada MT-II según su transitorio (A) y su tétano (B). En C se observa el marcaje positivo cuando se utilizó un anticuerpo antimiosina rápida (My-32, Sigma), lo cual demuestra que esta fibra es tipo II. Nótese el patrón sarcomérico en el cual las bandas fluorescentes (blancas) corresponden a bandas A de miosina y las negras a bandas I no marcadas

DISCUSIÓN

Los músculos esqueléticos, en general, están constituidos básicamente por 4 tipos de fibras denominadas: tipo I, IIA, IIX/D y IIB. La clasificación se realiza según la isoforma de la cadena pesada de miosina presente. Cada tipo de fibra tiene propiedades biofísicas y bioquímicas diferentes, aunque hay algo de solapamiento entre ellas (Bottinelli & Reggiani 2000). Las fibras tipo II son más rápidas que las tipo I (Bottinelli *et al.*, 1991) y dichas propiedades podrían estar relacionadas con la cinética de los movimientos de Ca^{2+} dentro del sarcoplasma: para que una fibra alcance más rápidamente su máxima amplitud durante una contracción y se relaje más rápidamente su cinética de Ca^{2+} debería ser más rápida. Con esta hipótesis nos propusimos evaluar la cinética de los transitorios de Ca^{2+} de fibras disociadas enzimáticamente de diferentes músculos. Utilizamos el FDB como modelo de músculo rápido, pues está compuesto básicamente por fibras IIX/D, IIA y muy pocas fibras tipo I (Allen *et al.*, 1993; González *et al.*, 2003) y el *Soleus* como modelo de músculo lento, compuesto principalmente por fibras tipo I y en menor proporción tipo IIA (Asmussen & Maréchal 1989; Maréchal & Beckers-Bleukx 1993).

Los trabajos abordando este tema se han centrado en comparar la cinética de los transitorios de Ca^{2+} según el músculo, sin considerar el tipo

de fibra estudiado, básicamente por las dificultades para aislar completamente fibras de diferentes músculos, debido a su gran tamaño. En este trabajo presentamos resultados con fibras de FDB y por primera vez con fibras de *Soleus* de ratón disociadas enzimáticamente como modelo que nos permite acceder a una fibra separada totalmente del resto del músculo y evaluarla posteriormente para determinar, mediante diferentes técnicas, el tipo de fibra utilizada.

Del estudio de los transitorios de los dos músculos hay varias observaciones interesantes: i) entre las fibras disociadas de FDB se observan 2 morfologías diferentes (MT-I y MT-II) a pesar de haber 3 tipos de fibras (I, IIA y IIX/D); ii) entre las fibras disociadas de *Soleus* se observa una sola morfología (MT-I), mientras que el músculo está compuesto por dos tipos de fibras (I y IIA); iii) todas las fibras de FDB con MT-II evaluadas para determinar su tipo demostraron ser rápidas (tipo II), en algunos casos se demostró que no eran tipo IIA, y en un caso se demostró que era tipo IIX/D, iv) entre las fibras con MT-I, de FDB y *Soleus*, evaluadas para determinar su tipo se encontraron tanto tipo I como IIA.

Los resultados presentados sugieren que la MT-I podría provenir tanto de las fibras tipo I como de las IIA, y la MT-II de las fibras tipo IIX/D.

Es interesante el hecho de que varios autores han reportado que las fibras rápidas tienen más unidades liberadoras de Ca^{2+} que las fibras lentas (Hollingworth y Marshall, 1981; Franzini-Armstrong *et al.*, 1988), con lo cual están de acuerdo nuestros resultados en los cuales los transitorios MT-II tienen mayor amplitud y su fase de ascenso es más rápida que la de los MT-I. En cuanto a la recaptura de Ca^{2+} , está descrito que las fibras tipo I y IIA de ratón tienen menos parvalbúmina (una proteína que une Ca^{2+} en el sarcoplasma y favorece la relajación muscular) que las tipo IIX/D (Füchtbauer *et al.*, 1991). Así mismo, la cantidad de adenosín trifosfatasa del retículo sarcoplásmico (SERCA), una proteína involucrada en la recaptura de Ca^{2+} hacia el retículo (Hasselbach, 1998), también es menor en las fibras lentas que en las rápidas (Leberer y Pette, 1986; Ferguson y Franzini-Armstrong, 1988). Nuestros resultados muestran que los transitorios de las fibras con MT-II, que parecen ser tipo IIX/D, tienen anchos medios, tiempos de caída y constantes de caída más cortos, es decir, son más rápidos, que las fibras MT-I, grupo en el cual estarían las fibras lentas.

En conclusión, presentamos el hallazgo de dos poblaciones de fibras disociadas enzimáticamente de FDB y *Soleus* de ratón adulto que se pueden diferenciar por la cinética de sus transitorios de Ca^{2+} . Las evidencias presentadas sugieren que la MT-II proviene de fibras tipo IIX/D, ya que: i) dicha morfología está presente entre las fibras disociadas de FDB en un porcentaje cercano al

que se encuentra este tipo de fibra en el músculo intacto, ii) no se encuentra entre las fibras disociadas de *Soleus*, (un músculo que no tiene este tipo de fibra), iii) las fibras evaluadas fueron positivas para el anticuerpo antimiosina rápida My-32 y negativas para el anticuerpo antimiosina IIA SC-71, iv) el BTS inhibe la contracción de fibras con esta morfología y v) una fibra evaluada mediante electroforesis mostró que tiene miosina tipo IIX/D. Nuestros resultados también sugieren que la MT-I proviene tanto de las fibras tipo I como de las tipo IIA, pues: i) dicha morfología está presente entre las fibras disociadas de FDB en un porcentaje cercano a la suma de los porcentajes a los que se encuentran estas fibras en el músculo intacto, ii) es la única morfología que se encuentra entre las fibras disociadas de *Soleus* (un músculo que sólo contiene estos 2 tipos de fibras), iii) algunas fibras evaluadas fueron positivas para los anticuerpos antimiosina rápida My-32 y antimiosina IIA SC-71, iv) el BTS muestra efecto inhibitorio de la contracción en algunas de las fibras pero no en otras y v) de dos fibras de *Soleus* evaluadas mediante electroforesis una mostró que contenía miosina tipo IIA y la otra tipo I.

Poder determinar el tipo de fibra muscular esquelética con la que se trabaja mediante la determinación de la morfología y cinética del transitorio de Ca^{2+} ayudará en el estudio de fenómenos fisiológicos y biofísicos según el tipo de fibra que hasta ahora no han sido aclarados básicamente por dificultades técnicas.

LITERATURA CITADA

- ALLEN, D., S. DUTY AND H. WESTERBLAD
1993. Metabolic changes in muscle during exercise: their effects on muscle function. *Proc. Aust. Physiol. Pharmacol. Soc.*, 24:65-75.
- ALLEN, D., G. LAMB AND WESTERBLAD
2008. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol. Rev.*, 88:287-332.
- ANDRADE, F., M. REID, D. ALLEN AND H. WESTERBLAD
1998. Effects of hydrogen peroxide and dithiotreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J. Physiol.*, 509(2):565-575.
- ASMUSSEN, G. AND G. MARÉCHAL
1989. Maximal shortening velocities, isomyosins and fibre types in soleus muscle of mice, rats and guinea pigs. *J. Physiol.*, 416:245-254.

- BARNARD, R., V. EDGERTON, T. FURUKAWA AND J. PETER
1971. Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.*, 220:410-414.
- BAYLOR, S. AND S. HOLLINGWORTH
2003. Sarcoplasmic reticulum calcium release compared in slow-twitch and fast-twitch fibres of mouse muscle. *J. Physiol.*, 551:125-138.
- BEKOFF, A. AND W. BETZ
1977. Physiological properties of dissociated muscle fibres obtained from innervated and denervated adult rat muscle. *J. Physiol.*, 271:25-40.
- BOLAÑOS, P., A. GUILLÉN, H. ROJAS, S. BONCOMPAGNI AND C. CAPUTO
2008. The use of calcium-orange-5N as a specific marker of mitochondrial Ca²⁺ in mouse skeletal muscle fibers. *Eur. J. Physiol.*, 455:721-731.
- BOTTINELLI, R. AND C. REGGIANI
2000. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 73: 195-262.
- BOTTINELLI, R., S. SCHIAFFINO AND C. REGGIANI
1991. Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J. Physiol.*, 437:655-672.
- BROOKE, M. AND K. KAISER
1970. Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.*, 18(9):670-72.
- BURKE, R., D. LEVINE AND F. ZAJAC
1971. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science*, 174:709-12.
- CALDERÓN-VÉLEZ, J., P. BOLAÑOS Y C. CAPUTO
2009. Functional identification of fiber types in enzymatically dissociated murine *flexor digitorum brevis* and *soleus* muscles. *Biophys. J.*, 96(3-S1): 233a.
- CALDERÓN-VÉLEZ, J. Y C. FIGUEROA-GORDON
2009. El acoplamiento excitación-contracción: preguntas por responder a pesar de 50 años de estudio. *Biomedica*, 29:140-160.
- CAPOTE, J., P. BOLAÑOS, R. SCHUHMEIER AND C. CAPUTO
2005. Calcium transients in developing mouse skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, 564(2):451-464.
- CAPUTO, C.
2001. Calcium release in skeletal muscle: from K⁺ contractures to Ca²⁺ sparks. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 22:485-504.
- CARROLL, S., M. KLEIN AND M. SCHNEIDER
1995. Calcium transients in intact rat skeletal muscle fibers in agarosa gel. *Am. J. Physiol.*, 269:C28-C34.
- CARROLL, S., M. KLEIN AND M. SCHNEIDER
1997. Decay of calcium transients after electrical stimulation in rat fast- and slow-twitch skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, 501(3):573-588.
- CHEUNG, A., J. DANTZIG, S. HOLLINGWORTH, S. BAYLOR, Y. GOLDMAN, T. MITCHISON T, et al.,
2002. A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II. *Nat. Cell. Biol.*, 4:83-89.
- CLOSE, R.
1972. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.*, 52(1):129-97.
- DUBOWITZ, V. AND A. PEARSE
1960. A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Histochemie*, 2:105-117.
- ENGEL, W.
1962. The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology*, 12:778-794.
- EUSEBI, F., R. MILEDI AND T. TAKAHASHI
1980. Calcium transients in mammalian muscles. *Nature*, 284:560-61.
- FERGUSON, D. AND C. FRANZINI-ARMSTRONG
1988. The Ca²⁺ ATPase content of slow and fast twitch fibers of guinea pig. *Muscle Nerve*, 11:561-570.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C., D. FERGUSON AND C. CHAMP
1988. Discrimination between fast- and slow-twitch fibres of guinea pig skeletal muscle using the relative surface density of junctional transverse tubule membrane. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 9:403-414.
- FÜCHTBAUER, E., A. ROWLERSON, K. GOTZ, G. FRIEDRICH, K. MABUCHI, J. GERGELY et al.,
Direct correlation of parvalbumin levels with myosin isoforms and succinate dehydrogenase activity on frozen sections of rodent muscle. *J. Histochem. Cytochem.*, 39(3):355-361.
- GONZÁLEZ, E., M. MESSI, Z. ZHENG AND O. DELBONO
2003. Insulin-like growth factor-1 prevents age-related decrease in specific force and intracellular Ca²⁺ in single intact muscle fibres from transgenic mouse. *J. Physiol.*, 552:833-844.
- GUTH, L. AND F., SAMAHA
Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 1969;25:138-152.

HASSELBACH, W.

1998. The Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum in skeletal and cardiac muscle. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 853:1-8.

HOLLINGWORTH, S. AND M. MARSHALL

1981. A comparative study of charge movement in rat and frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, 321: 583-602.

LEBERER, E. AND D. PETTE

1986. Immunochemical quantification of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, of calsequestrin and of parvalbumin in rabbit skeletal muscles. *Eur. J. Biochem.*, 156:489-496.

MARÉCHAL, G. AND G. BECKERS-BLEUKX

1993. Force-velocity relation and isomyosins in soleus muscles from two strains of mice (C57 and NMRI). *Pflügers Arch.*, 424:478-487.

PETER, J., R. BARNARD, V. EDGERTON, C. GILLESPIE AND K. STEMPEL

1972. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, 11(14):2627-2633.

RANVIER, L.

1873. Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs, chez les Lapins et chez les Raies. *Compt. Rend.*, 77:1030-34.

SARTORIUS, C, B. LU, L. ACAKPO-SATCHIVI, R.

JACOBSEN, W. BYRNES AND L. LEINWAND

1998. Myosin heavy chains IIa and IIb are functionally distinct in the mouse. *J. Cell. Biol.*, 141(4):943-53.

STEIN, J. AND H. PADYKULA

1962. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *Am. J. Anat.*, 110:103-23.

TALMADGE, R. AND R. ROY

1993. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J. Appl. Physiol.*, 75(5):2337-2340.

WESTERBLAD, H. AND D. ALLEN

1991. Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. *J Gen Physiol.*, 98(3):615-635.