

## CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO HISTOQUÍMICO Y MORFOMÉTRICO DE LAS FIBRAS TIPO IIb EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DEL PERRO

Contribution to the histochemical and morphometric study of the type IIb fibres in dog skeletal muscle

Gil, F.; Vázquez, J. M. y Moreno, F.\*

\* Departamento de Anatomía y Embriología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.

Recibido: 28 julio 86  
Aceptado: 31 octubre 86

### RESUMEN

Mediante técnicas histoquímicas (de ATPasa) y morfométricas, se analizan secciones transversales seriadas de los músculos tibial craneal y flexor digital lateral de perros adultos. Además de los tipos fibrilares descritos usualmente para el músculo de esta especie (I, IIa y IIc), se observan fibras cuyas características histoquímicas permiten considerar la presencia del tipo IIb en el músculo del perro.

*Palabras clave:* Músculo esquelético, Tipos Fibras, ATPasa, Perro.

### ABSTRACT

By means of histochemical (ATPase) and morphometric techniques, cross-sections of tibialis cranialis and flexor digitorum lateralis muscles of mature dogs were analyzed. In addition to the fibrillar types usually found in this species (I, IIa, IIc), there are others whose histochemical characteristics allow to conclude the presence of type fiber IIb in these muscles.

*Keywords:* Skeletal Muscle, Fibre Types, ATPase, Dog.

### INTRODUCCIÓN

En base a la labilidad o estabilidad mostrada por la ATPasa miosínica de la fibra muscular ante medios alcalinos y ácidos, BROOKE/KAISER (1970) consiguen diferenciar hasta cuatro tipos de fibras en el músculo de la especie humana, que denominan tipo I (ATPasa alcalinolábil y ácido-estable), IIa (ATPasa alcalino-estable y ácido-lábil), IIb (ATPasa alcalino-estable, ácido-estable a pH 4'6, pero ácido-lábil a pH 4'3) y IIc (ATPasa alcalino-estable y ligeramente ácido-estable a pH ácidos), distinguibles entre sí por la distinta intensidad tintorial que adoptan cuando secciones transversales de tejido muscular se someten a técnicas que detectan dicha enzima.

Al extrapolar estos resultados a músculos de la especie canina, la mayoría de los autores resaltan el hecho de no evidenciar fibras tipo IIb (CARDINET et al., 1980; BRAUND et al., 1982; GREEN et al., 1982) e incluso algunos recurren al empleo de técnicas inmunohistoquímicas para corroborar esto último (SNOW et al., 1982). Sin embargo, GOLLNICK et al. (1983) y MATOBA et al. (1985), no encuentran tal diferencia cuando comparan músculos de perro con los de otras especies.

En el presente trabajo reflejamos nuestras propias conclusiones, con objeto de contribuir al esclarecimiento de las circunstancias que, de alguna forma, han dificultado la tipificación fibrilar en el músculo del perro (MAXWELL et al., 1977; ARMSTRONG et al., 1982).

CUADRO I  
 ESQUEMA DE LOS GRADOS DE INTENSIDAD QUE OFRECEN LOS TIPOS DE FIBRAS  
 MUSCULARES ANTE TÉCNICAS ATPásicas CON PREINCUBACIONES A DIFERENTES pH.

	pH 9,4	pH 4,6	pH 4,3
Tipo I	Horizontal lines	Diagonal lines (top-left to bottom-right)	Diagonal lines (top-left to bottom-right)
Tipo IIa	Diagonal lines (top-left to bottom-right)	Horizontal lines	
Tipo IIb	Diagonal lines (top-left to bottom-right)	Vertical lines	
Tipo IIc	Diagonal lines (top-left to bottom-right)	Grid pattern	Grid pattern

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado secciones de los músculos tibial craneal y flexor digital lateral de 8 perros adultos, raza pastor belga. Las muestras se obtuvieron tras ser anestesiados los animales con tiopental sódico (pentothal). A continuación, fueron congeladas en 2-Metilbutano (Merck) siguiendo los criterios recomendados por DUBOWITZ/BROOKE (1973). El corte de las muestras se realizó en criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , entre 8 y 12 micras. Las secciones fueron teñidas primeramente con Hematoxilina-Eosina para comprobar la correcta disposición transversal de las miofibrillas y la presencia o ausencia de artefactos debidos al proceso de la congelación. Son sometidas, con posterioridad, a técnicas de ATPasa (DUBOWITZ/BROOKE, 1973) con una preincubación alcalina (pH 9.4) y dos ácidas (pH 4.6 y 4.3).

La estimación del tamaño fibrilar fue realizada con un analizador de imagen IBAS-1, seleccionando los parámetros área y diámetro menor de una estructura elíptica equivalente,

analizando un número de fibras superior a 150 (excepto cuando éstas no alcanzan dicho número en toda la sección) y no haciendo distinción entre machos y hembras, ni entre miembros derechos e izquierdos, según lo referido por BLOMSTRAND/EKBLON (1982) y SHOREY/CLELAND (1983). Los estudios relativos al porcentaje fibrilar se llevan a cabo tras contar entre 500 y 1.000 fibras de un campo elegido al azar, previamente proyectado sobre una pantalla gracias a la incorporación de un sistema de lentes adaptado al ocular del microscopio. El análisis estadístico lo referimos principalmente al diámetro menor, para salvar los errores debidos a una posible oblicuidad en el corte. Este análisis se obtiene mediante el programa «STUDD» (Palazón, 1986; comunicación personal) que realiza la prueba de igualdad de varianzas con la correspondiente prueba de igualdad de medias basadas en el test F-snedecor y la prueba t-Student.

Las preparaciones se fotografiaron en un fotomicroscopio «Leitz Dialux 20», a 100 y 400 aumentos, utilizando películas en blanco y negro, y color.

CUADRO 2  
RESULTADOS MORFOMÉTRICOS RELATIVOS A PORCENTAJES Y TAMAÑO FIBRILAR DEL M. TIBIAL CRANEAL. LOS VALORES OBTENIDOS PARA ÁREAS Y DIÁMETRO MENOR VIENEN EXPRESADOS EN  $\mu\text{m}^2$  Y  $\mu\text{m}$ , RESPECTIVAMENTE

M. TIBIAL CRANEAL		AREAS		DIÁMETRO MENOR				
FIBRAS	%	$\bar{X}$	Sd	$\bar{X}$	Sd	C.V.%	LÍMITES CONFIANZA DE LA MEDIA al 95%	
							I	L
TIPO I	29.37	2180.64	747.58	43.41	9.61	22.13	42.06	44.75
TIPO IIa	65.03	3433.94	1110.47	55.07	10.65	19.33	53.49	56.64
TIPO IIb	2.53	2763.33	571.93	47.35	7.65	16.15	45.86	48.83
TIPO IIc	3.07	3468.74	1190.25	54.14	11.53	21.29	50.71	57.56

CUADRO 3  
**RESULTADOS MORFOMÉTRICOS RELATIVOS A PORCENTAJES Y TAMAÑO FIBRILAR DEL M. FLEXOR DIGITAL LATERAL. LOS VALORES OBTENIDOS PARA ÁREAS Y DIÁMETRO MENOR VIENEN EXPRESADOS EN  $\mu\text{m}^2$  Y  $\mu\text{m}$ , RESPECTIVAMENTE**

M. FL. DIGITAL LATERAL		AREAS		DIAMETRO MENOR			LIMITES CONFIANZA DE LA MEDIA al 95%	
FIBRAS	%	$\bar{X}$	Sd	$\bar{X}$	Sd	C.V.%	L	L
TIPO I	23.27	2136.38	601.40	42.84	8.68	20.26	41.48	44.19
TIPO IIa	67.07	3846.18	1046.22	56.87	10.85	19.07	55.23	58.50
TIPO IIb	7.61	2209.86	315.76	43.93	6.54	14.88	41.39	46.46
TIPO IIc	1.95	2123.41	494.93	42.37	7.37	17.39	40.41	44.32

X = Media; Sd = Desviación típica; C.V.% = Coeficiente de variación

## RESULTADOS

Cuando analizamos secciones transversales seriadas de ambos músculos (tibial craneal y flexor digital lateral) sometidas a técnicas de ATPasa tras una preincubación alcalina (pH 9'4) y dos ácidas (pH 4'6 y 4'3), pudimos reconocer cuatro tipos de fibras (I, IIa, IIb y IIc) basándonos en los matices tintoriales que adoptan ante las referidas preincubaciones (figuras 1A, 1B y 1C), y que han quedado esquematizadas en el cuadro 1.

Mientras que las fibras I, IIa y IIc presentan características histoquímicas bastante comparables con las del músculo de la especie humana, las IIb (figura 1B) resultan ser ligeramente ácido-estables a pH 4'6, y únicamente fueron observadas en el 50% de las preparaciones estudiadas (figura 1D), lo que no impidió que las catalogáramos como tales. Este hecho debe ser tenido en cuenta a la hora de estable-

cer los porcentajes finales (cuadros 2 y 3). Asimismo, los valores medios de sus diámetros no coinciden en ambos músculos, pues mientras que en el tibial craneal su tamaño no guarda relación con ninguno de los otros tipos (cuadro 2), en el flexor se aproxima al de las fibras I y IIc (cuadro 3).

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados confirman la existencia en el músculo del perro de fibras con unas características histoquímicas (referidas a la ATPasa miosínica) que hacen posible su separación de las restantes IIa y IIc, y que hemos denominado IIb a pesar de que su matiz tintorial no coincide plenamente con el de las descritas para el músculo de la especie humana (BROOKE/KAISER, 1970). Venimos a coincidir por tanto, con las observaciones de GOLLNICK

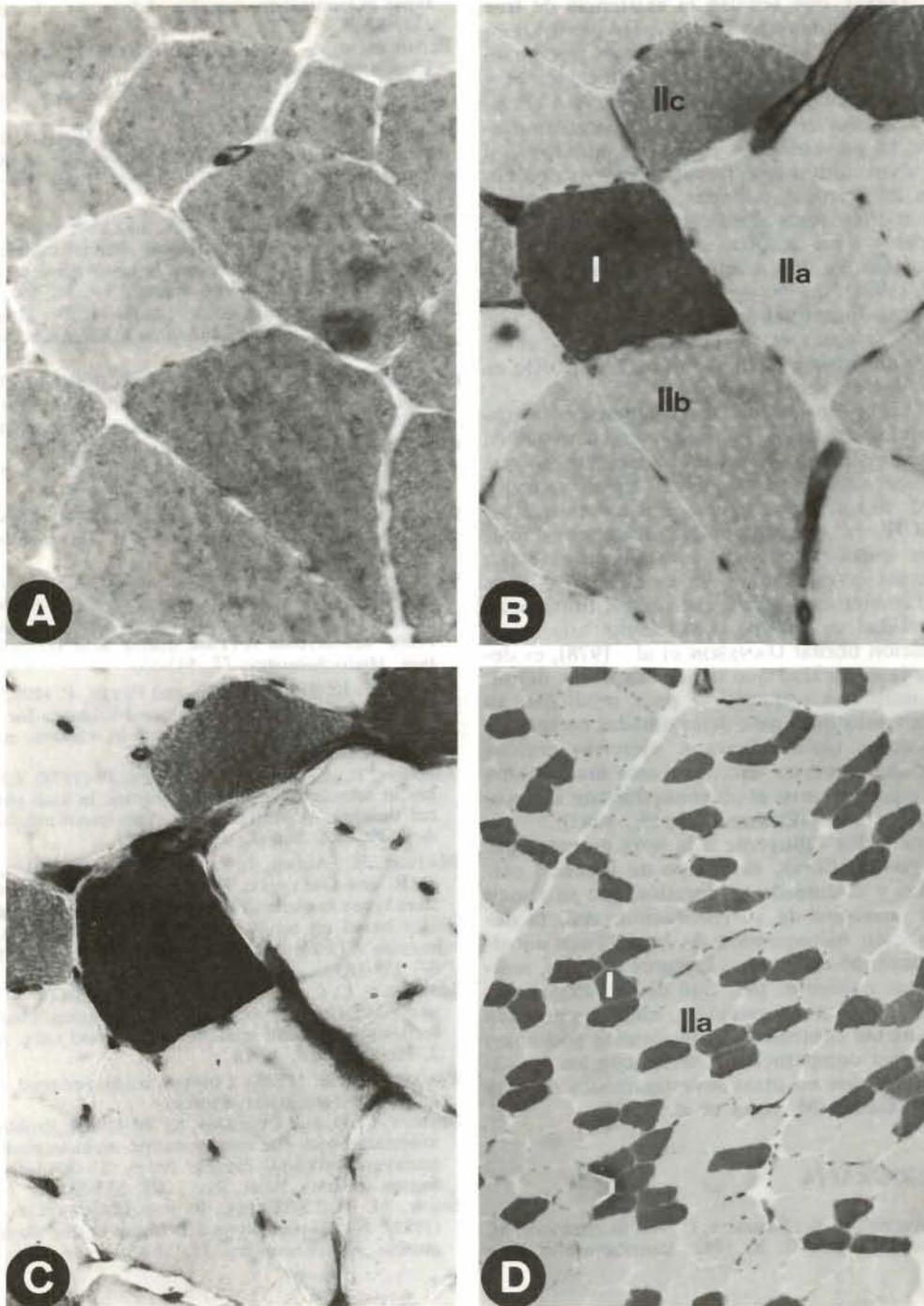


FIGURA 1. A, B y C: Secciones transversales seriadas del M. tibial craneal, sometidas a técnicas de ATPasa tras preincubaciones a pH 9'4, 4'6 y 4'3, respectivamente. 400X. D: Sección transversal del M. flexor digital lateral. Reacción ATPasa tras preincubación ácida (pH 4'6). 100X.

et al. (1983), que señalan la existencia de tres subtipos de fibras tipo II (IIA<sub>1</sub>, IIA<sub>2</sub> y IIA<sub>3</sub>) en el músculo de la especie estudiada por nosotros, cuando controlan con precisión los pH y tiempos de incubación de las técnicas ATPásicas. MATOBA et al. (1985) corroboran nuevamente la presencia de estos tres subtipos, si bien ahora introducen preincubaciones con cobre a las técnicas referidas, y señalan que no existen diferencias significativas entre las fibras del perro y las de otras especies. Disentimos, en cambio, de los resultados de BRAUND/LINCOLN (1981), que ni siquiera observan este tipo de fibras durante el desarrollo postnatal y, con los de BRAUND et al. (1982) y GREEN et al. (1982) que sólo evidencian tipos I, IIa y IIc en músculos de perros adultos.

El hecho de que no observáramos este tipo de fibras en todos los músculos estudiados, unido a los distintos valores morfométricos que expresan según se trate del M. tibial craneal o del M. flexor digital lateral, nos indica que las fibras IIb no constituyen población constante, lo que quizás pueda ser la explicación de por qué unos investigadores las evidencian y otros no. También es posible que dichas fibras sean en realidad un subtipo consecuente a la transformación fibrilar (JANSSON et al., 1978), es decir, a la capacidad que tienen las fibras del tejido muscular esquelético para modificar su ATPasa miosínica ante determinadas exigencias funcionales (sobreesfuerzos, ejercicio prolongado, sedentarismo, etc...), o ante los cambios que se producen en el músculo durante el desarrollo postnatal (CARDINET et al., 1983).

Otro factor influyente a la hora de catalogar los tipos de fibras, es el tipo de técnicas empleadas y el cuidado y precisión que se ponen en el momento de su realización. Así, la demostración histoquímica de la ATPasa miosínica depende de muchos factores (tiempo, temperatura ambiente, pH, tipo de Buffer y composición iónica del medio), y mientras no sean rígidamente controlados, difícilmente podremos establecer comparaciones serias con los hallazgos obtenidos en otras investigaciones de esta misma índole (MATOBA et al., 1985).

## BIBLIOGRAFÍA

- ARMSTRONG, R. B.; SAUBERT, C. W.; SEEHERMAN, H. J. and TAYLOR C. R. 1982: Distribution of fiber types in locomotory muscles of dogs. *Am. J. Anat.*, **163**, 87-98.
- BLOMSTRAND, E. and EKBLÖM, B. (1982): The needle biopsy techniques for fibre type determination in human skeletal muscle. A methodological study. *Acta Physiol. Scand.*, **116**, 437-442.
- BRAUND, K. G. and LINCOLN, C. E. (1981): Histochemical differentiation of fiber types in neonatal canine skeletal muscle. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 407-415.
- BRAUND, K. G.; MCGUIRE, J. A. and LINCOLN, C. E. (1982): Observations on normal skeletal muscle of mature dogs: A cytochemical, histochemical and morphometric study. *Vet. Pathol.*, **19**, 577-595.
- BROOKE, M. H. and KAISER, K. K. (1970): Muscle fibre types: How many and what kind? *Arch. Neurol.*, **23**, 369-379.
- CARDINET, G. H. (1980): Neuromuscular disease: The diagnosis and classification of muscle disease in dog. *Proceeding of the 4th Kal Kan Symposium*.
- CARDINET, G. H.; LEONG, C. L. and MEANS, P. S. (1983): Differentiation of myofiber types in canine pectineal muscle. *Reports of the W.A.V.A.*
- DUBOWITZ, V. and BROOKE, M. H. (1973): «Muscle Biopsy: A Modern Approach». W. B. Saunders, London.
- GOLLNICK, P. D.; PARSONS, D. and OAKLEY, C. R. (1983): Differentiation of fiber types in skeletal muscle from the sequential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation. *Histochemistry*, **77**, 543-555.
- GREEN, H. J.; REICHMAN, H. and PETTE, P. (1982): A comparison of two ATPase based schemes for histochemical muscle fibre typing in various mammals. *Histochemistry*, **76**, 21-31.
- JANSSON, E.; SJODIN, B. and TESCH, P. (1978): Changes in muscle fiber type distribution in man physical training. A sing of fiber type transformation? *Acta Physiol. Scand.*, **104**, 235-237.
- MATOBA, H.; ALLEN, J. R.; BAYLY, W. M.; OAKLEY, C. R. and GOLLNICK, P. D. (1985): Comparison of fiber types in skeletal muscles from ten animal species based on sensitivity of the myofibrillar actomyosin ATPase to acid or copper. *Histochemistry*, **82**, 175-183.
- MAXWELL, L. C.; BARKLAY, J. K.; MOHRMAN, D. E. and FAULKNER, J. A. (1977): Physiological characteristics of skeletal muscles of dogs and cats. *Am. J. Physiol.*, **233**, 14-18.
- PALAZÓN, J. A. (1986): Comunicación personal. Facultad de Veterinaria, Murcia.
- SHOREY, C. D. and CLELAND, K. W. (1983): Problems associated with the morphometric measurement of transverse skeletal muscle fibers. I. Analysis of frozen sections. *Anat. Rec.*, **207**, 523-531.
- SNOW, M. H.; BILLETER, R. and MASCARELLO, F. (1982): No classical type IIB fibres in dog skeletal muscle. *Histochemistry*, **75**, 53-65.