



Universidad
Zaragoza

**Caracterización de las propiedades contráctiles a
fatiga del músculo esquelético. Metodología
experimental y de simulación.**



Marta Sierra Arregui

Memoria Proyecto Fin de Máster

Directora: M^a Jesús Muñoz Gonzalvo

Máster de Iniciación a la Investigación en Ciencias Veterinarias

Curso 2011-2012

Agradecimientos

A M^a Jesús, por permitirme trabajar en un proyecto tan interesante y haberme abierto la puerta a tantas oportunidades. A Jorge, por su paciencia en la enseñanza de nuevos conocimientos y su inestimable ayuda en la elaboración de este trabajo. A Javier y Fernando por su imprescindible colaboración para sacar adelante este trabajo. A Carlos y Aitor por su predisposición y buen hacer en las tareas de laboratorio. Y por último, a todos los animales que han hecho posible este proyecto.

Índice general

Índice de Figuras	2
Índice de Tablas	4
1. Resumen	6
2. Introducción	7
2.1. Antecedentes	7
2.2. Objetivos	9
3. Revisión bibliográfica	10
3.1. El músculo esquelético	10
3.2. Modelos computacionales	24
4. Material y Métodos	26
4.1. Dispositivo experimental	26
4.2. Modelos de simulación computacional	30
5. Resultados	36
6. Discusión	40
7. Conclusiones	42
Bibliografía	42

Índice de figuras

1.	Esquema de la fibra muscular.	10
2.	Esquema de la fibra muscular (Victor L. Katch, 2006)	11
3.	Esquema del interior de la fibra muscular.	12
4.	Esquema del sarcomero (José López Chicharro, 2006)	12
5.	Molécula de la miosina (Copyright © 2007 Pearson Education, Inc, publishing as Benjamin Cummings.)	13
6.	Molécula de la actina, con las proteínas Troponina y Tropomiosina asociadas (Copyright © 2007 Pearson Education, Inc, publishing as Benjamin Cummings.)	14
7.	Esquema de la contracción (Copyright © 2007 Pearson Education, Inc, publishing as Benjamin Cummings.)	15
8.	Tipos de acción muscular.	17
9.	Relación longitud-tensión.	18
10.	Imagen que ilustra la diferencia entre los distintos tipos de fibras, tanto a nivel de fuerza como de tiempo de mantenimiento de la misma.	21
11.	Imagen histológica que diferencia entre las fibras lentas (tipo I) y las fibras rápidas (tipo II).	22
12.	Disección del músculo TA paso a paso	27
13.	Posición del músculo EDL, TA y Sóleo en la máquina de ensayos. . .	28
14.	Máquina Instron. Tomada y modificada de Instron Corporation 2000	29
15.	Generador de señal eléctrica CIBERTEC CS-20	29
16.	Representación de la función f_{tren} para cuatro valores de la frecuencia de estímulo (90, 60, 30 y 10 Hz).	34

17. Evolución de la fuerza isométrica en el tiempo para: (a) Músculo TA. (b) Músculo EDL. (c) Músculo Sóleo. (d) Tasa de fatigabilidad para los tres músculos, expresada en N/s	36
18. Curvas de ajuste siguiendo el modelo unidimensional propuesto por Ramírez <i>et al.</i> (2010): (a) Músculo TA. (b) Músculo EDL. (c) Múscu- lo Sóleo.	38

Índice de cuadros

1.	Tabla de enzimas en relación al tipo de fibras (Victor L. Katch, 2006).	21
2.	Características de los tipos de fibra muscular (Victor L. Katch, 2006).	23
3.	Tiempo empleado por los diferentes músculos para alcanzar la fuerza máxima y porcentaje de reducción de esa fuerza al finalizar el estímulo.	37
4.	Datos de ajuste utilizando el modelo propuesto por Ramírez <i>et al..</i> (2010)	39

1. Resumen

El objetivo principal de este trabajo es la caracterización de las propiedades contráctiles de tres músculos diferentes de rata (Tibialis Anterior, Extensor Digitorium Longus y Sóleo) sometidos a contracciones isométricas máximas sostenidas hasta que llegan a fatiga. Este estudio pretende obtener los parámetros necesarios para el desarrollo de un modelo computacional de simulación. Los experimentos se han realizado “*in vivo*” en tres grupos ($n = 5$) de ratas Wistar macho ($313 \pm 81,14g$) utilizando un protocolo diseñado expresamente para estas experiencias. Los músculos han sido sometidos a estímulos eléctricos con el objetivo de alcanzar la contracción tetánica durante diez segundos. La metodología propuesta permite obtener las propiedades del músculo esquelético en fatiga y relacionarlas con los diferentes tipos de fibras presentes en los músculos y los cambios en la geometría producidos durante la contracción. Además, se ha procedido a ajustar un modelo matemático desarrollado previamente con los nuevos datos experimentales recogidos para desarrollar futuros modelos computacionales basados en el método de elemetos finitos. Estos datos también han permitido verificar el buen planteamiento de dicho modelo.

2. Introducción

2.1. Antecedentes

El trabajo que se presenta ha sido realizado dentro de una línea de investigación multidisciplinar que tiene como objetivo el modelado del tejido músculo-esquelético.

Los modelos matemáticos se han utilizado de manera creciente en la investigación y simulación de sistemas biológicos, especialmente en procesos de rehabilitación, procedimientos de cirugías reconstructivas, estudios en biomecánica del deporte, etc. Los modelos computacionales que incorporan formulaciones matemáticas del comportamiento mecánico de los tejidos están siendo utilizados actualmente de manera general y son objeto de continuo estudio y desarrollo.

El método de Elementos Finitos es la herramienta más utilizada para simular el comportamiento mecánico de tejidos vivos. Los modelos desarrollados con esta técnica incorporan diferentes niveles de sofisticación y pueden ser utilizados para entender, por ejemplo, los fenómenos asociados con el comportamiento muscular a niveles microscópicos. Además, los modelos computacionales pueden ser una herramienta efectiva en el estudio del comportamiento biomecánico de las articulaciones y muchos otros sistemas biológicos (Majors and Wayne, 2011).

La precisión de estos modelos de simulación está directamente relacionada con los parámetros que caracterizan el comportamiento mecánico de los tejidos reales. En el caso del músculo esquelético que causa el movimiento de las articulaciones, son necesarias tanto las propiedades pasivas como activas del músculo. Tanto el comportamiento pasivo de las estructuras elásticas del músculo como su comportamiento activo generado por su actividad contráctil han sido los primeros que se han caracterizado a partir del animal “*in vivo*” por el grupo de investigación, con el fin de desarrollar un modelo matemático básico que describa el comportamiento del músculo.

Este modelo se ha obtenido a partir de datos experimentales, sometiendo al músculo Tibial Anterior (TA) de rata a contracciones de muy corta duración (1ms).

Es bien sabido que si estas contracciones se mantienen en el tiempo, la capacidad de contracción del músculo disminuye y esto se ve influenciado por el diferente comportamiento de los diferentes tipos de fibras musculares.

2.2. Objetivos

Objetivo general del trabajo:

Aplicar el modelo matemático obtenido al comportamiento de las propiedades contráctiles de los músculos con diferente composición de fibras a los que se les somete a contracciones mantenidas en el tiempo.

Para desarrollar este objetivo general, se pretende alcanzar las siguientes objetivos específicos:

1. Adaptación y puesta a punto del sistema mecánico utilizado en trabajos previos y basado en una máquina universal de ensayos para obtener la fuerza desarrollada por un músculo “*in vivo*” bajo un protocolo adecuado de estímulos que lleven al mismo hasta un estado de fatiga.
2. Diseño de un protocolo para medir la fuerza desarrollada por músculos de diferentes tipos: carácter rápido (Tibialis Anterior), comportamiento mixto (Extensor Digitorium Longus) y carácter lento (Soleus) ante diferentes parámetros de un estímulo eléctrico aplicado sobre el mismo a través del nervio ciático.
3. Aplicación del modelo a los datos experimentales obtenidos.

3. Revisión bibliográfica

3.1. El músculo esquelético

El músculo esquelético es un tejido heterogéneo, rodeado en su porción externa por tejido conjuntivo llamado epimisio que se continúa con los tendones que unen los músculos al hueso (Figura 1)

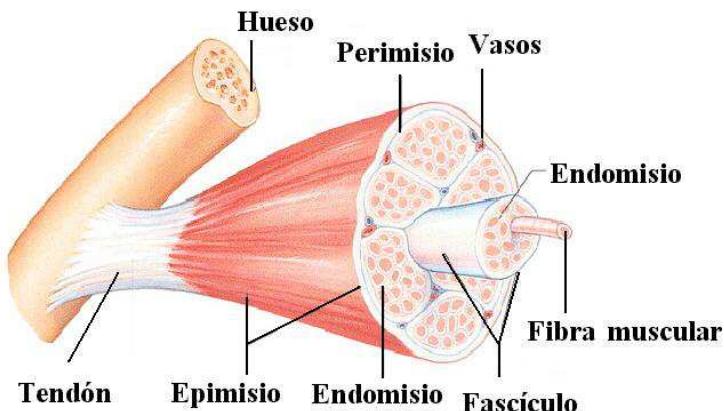


Figura 1: Esquema de la fibra muscular.

La organización del músculo desde el nivel macroscópico al molecular es la siguiente:

Cada músculo está constituido por la agrupación de fascículos musculares. Estos fascículos se rodean de otra capa del tejido conjuntivo llamada perimisio. Cada uno de los fascículos, está formado por varias fibras musculares, que constituyen cada una de ellas, la unidad estructural o célula muscular. Cada fibra está rodeada a su vez por el endomisio, como puede verse en la imagen. A su vez, dentro de cada célula podemos observar la presencia de miofibrillas cuyo número puede oscilar entre varios centenares a varios millares.

En el orden molecular, cada miofibrilla está formada por filamentos que, bioquímicamente, corresponden a proteínas de varios tipos: contráctiles (actina y miosina), moduladoras (tropomiosina y troponina) y otras proteínas (nebulina y titina).

En un corte longitudinal del músculo podemos observar que, a intervalos de 2 – 2,5 μm de longitud, se encuentran las líneas Z, que atraviesan y subdividen las miofibrillas y delimitan la unidad funcional de la célula muscular, denominada sarcómero (Figura 2)

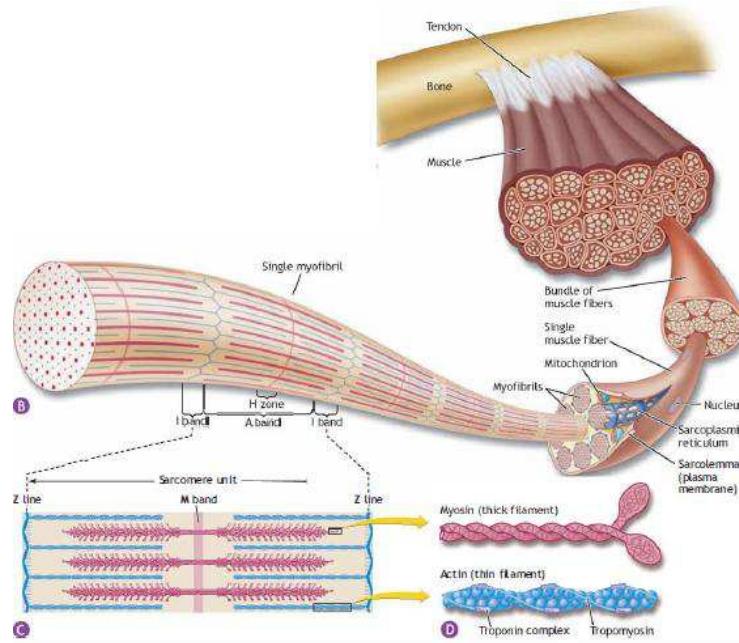


Figura 2: Esquema de la fibra muscular (Victor L. Katch, 2006)

En el citoplasma o sarcoplasma, las fibras musculares presentan un extenso retículo sarcoplásmico. Este orgánulo se ocupa de concentrar y secuestrar iones de calcio. Asociados a este retículo sarcoplásmico, se encuentran los túbulos T, que son invaginaciones de la membrana celular que permiten la transmisión del impulso nervioso producido en la placa motora hasta el interior de la célula. Además, en el sarcoplasma encontramos otros orgánulos como mitocondrias, aparatos de Golgi, mioglobina, gránulos de glucógeno y depósitos de triglicéridos, todo lo necesario para obtener la energía suficiente para la contracción (Figura 3).

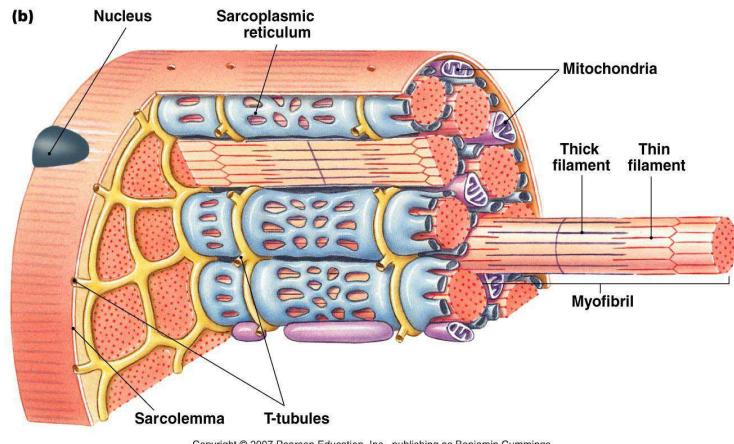


Figura 3: Esquema del interior de la fibra muscular.

Como se ha indicado, el sarcómero es la unidad funcional básica de una miofibrilla. El sarcómero está limitado por las líneas Z, como puede observarse en la imagen. Entre estas líneas Z encontramos, dos bandas I (zonas claras), dos bandas A (zonas oscuras) y una zona H situada en el medio de la estructura. Los filamentos que componen el sarcómero son la actina y la miosina. La banda I se corresponde a una zona donde sólo hay filamentos de actina, la banda A se corresponde con la zona donde se intercalan filamentos de actina y de miosina y la zona H que sólo aparece cuando del sarcómero está en reposo (Figura 4)

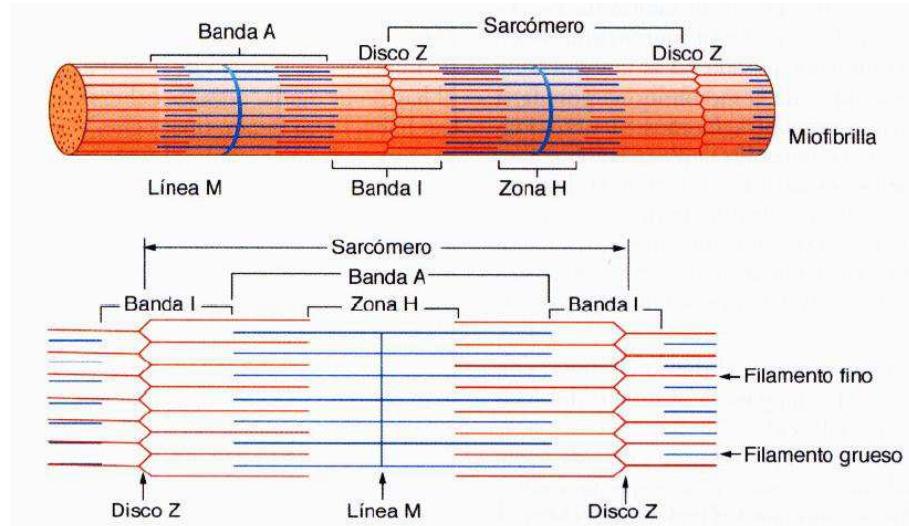


Figura 4: Esquema del sarcomero (José López Chicharro, 2006)

La molécula de miosina está formada por seis proteínas, dos proteínas pesadas que se entrelazan formando una cola y una estructura globular (cabeza). En la zona de la cabeza, las cadenas ligera se entrelazan con las proteínas pesadas (Figura 5). Cada filamento de miosina tiene varias de estas cabezas que sobresalen del filamento para formar puentes cruzados que interactúan con los puntos activos de la actina durante la contracción. Es en esta zona de la cabeza donde se encuentra el dominio catalítico y el punto de unión a la actina. Una de las características de la cabeza de la miosina es que actúa como una enzima ATPasa, lo que permite que hidrolice el ATP y utilice la energía obtenida para el proceso de contracción. Cada isoforma de la cadena pesada de la miosina, como se comentará más adelante, tiene su actividad ATPasa característica.

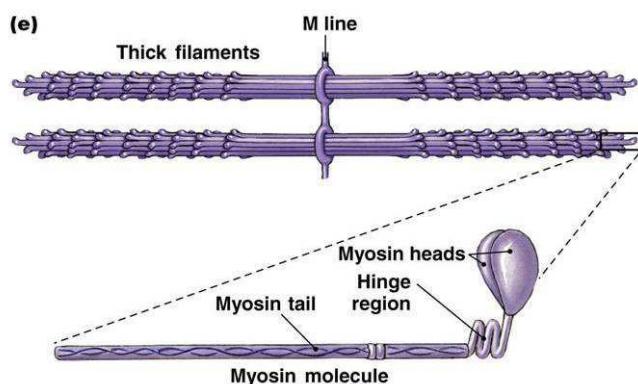


Figura 5: Molécula de la miosina (Copyright © 2007 Pearson Education, Inc, publishing as Benjamin Cummings.)

La proteína actina forma los filamentos finos de la miofibrilla, que se disponen paralelamente a los filamentos gruesos de miosina. Cada filamento de actina tiene varios sitios activos donde se adhiere la cabeza de la miosina. Además de la actina, en los filamentos delgados se encuentran otras dos proteínas: la tropomiosina y la troponina (Figura 6). Ambas se encuentran dispuestas alrededor de la actina y actúan de manera interrelacionada junto con iones calcio para mantener la relajación e iniciar la contracción de la miofibrilla.

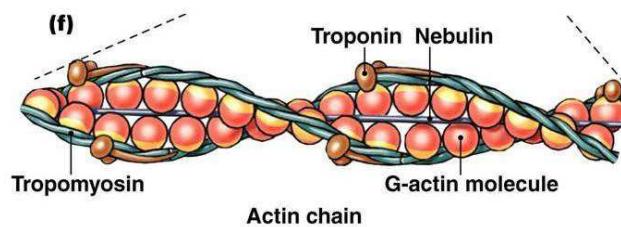


Figura 6: Molécula de la actina, con las proteínas Troponina y Tropomiosina asociadas (Copyright © 2007 Pearson Education, Inc, publishing as Benjamin Cummings.)

La titina es una proteína elástica que se encarga de estabilizar los elementos contráctiles y, gracias a su capacidad elástica, permite recuperar la longitud del músculo en relajación o reposo. Además, contribuye en la tensión pasiva del músculo. Junto con ella, se encuentra la nebulina, que no es elástica y que contribuye a la alineación de los filamentos finos en el sarcómero.

La contracción del músculo esquelético es un proceso activo que requiere un aporte energético por parte del ATP. Para que se lleve a cabo la contracción se necesitan iones calcio que liberen los puntos de unión actina-miosina y ATP, que será hidrolizado por la ATPasa de la cabeza de la miosina, liberando energía.

Acoplamiento neuromuscular

En reposo, se cree que las moléculas de tropomiosina se encuentran bloqueando los sitios activos de la actina, impidiendo su unión a la miosina. Cuando el impulso nervioso llega por la neurona motora, sus axones terminales liberan acetilcolina, que los receptores de la fibra muscular detectan. Esto hace que el impulso eléctrico llegue a la célula muscular y éste se transmita por los túbulos T al interior de la célula. El retículo sarcoplásmico libera el Ca^{2+} almacenado en su interior. Este calcio se une a la tropomiosina, ésta cambia de conformación y deja al descubierto los sitios activos de la actina. La miosina se une a ellos porque tiene una alta afinidad por la actina. El ATP se une a la cabeza de la miosina y ésta la hidroliza. La energía liberada permite la separación de actina y miosina. La miosina se une a un nuevo

sitio activo de la actina, situándose a 90° con respecto a los filamentos. Cuando el Pi se libera, la cabeza de la miosina rota y desplaza al filamento de actina, por último se libera el ADP y la miosina vuelve al estado inicial, a 45° con respecto a los filamentos (Figura 7)

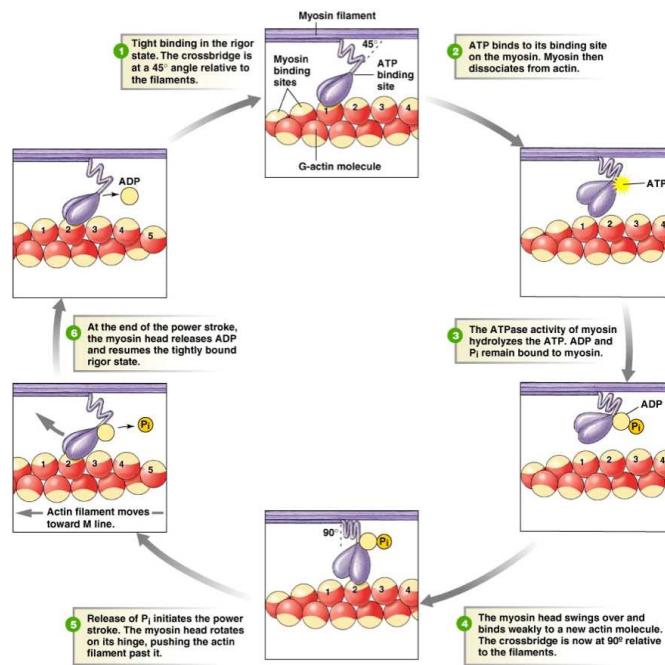


Figura 7: Esquema de la contracción (Copyright © 2007 Pearson Education, Inc, publishing as Benjamin Cummings.)

La fuerza muscular, desde un punto de vista mecánico, sería la capacidad de la musculatura para deformar un cuerpo o modificar su aceleración. El músculo esquelético está diseñado para producir fuerza. Y esta fuerza se entiende como la capacidad que tiene el músculo para producir tensión cuando se activa. Tanto si esta tensión es generada por la oposición de una resistencia externa como si se produce por la tensión simultánea de los músculos agonistas y antagonistas, esta tensión produce una deformación en el músculo. La magnitud de la deformación es un indicador del estrés producido por las fuerzas que originan dicha deformación. En este caso, las fuerzas de tensión son las que tiran internamente de las estructuras sometidas a la tensión. Por lo tanto, la tensión del músculo se puede definir como el grado de estrés mecánico producido por el eje longitudinal del músculo cuando las fuerzas internas

tienden a estirar o separar las moléculas que constituyen las estructuras musculares y tendinosas (González-Badillo JJ., 2002).

Se denomina unidad motora al conjunto de neurona motora y las fibras que inerva. De acuerdo a la cantidad de fuerza que se solicita al músculo, se recluta una cantidad mayor o menor de fibras musculares. Henneman (1957) describió el proceso de reclutamiento según el principio de tamaño: a medida que se solicita mayor fuerza, se van uniendo las unidades motoras de menor tamaño y las más grandes se unen cuando se requieren mayores niveles de fuerza. Como se explica más adelante, las fibras lentas son las de menor tamaño y serían las primeras en ser reclutadas, seguidas de las rápidas. Este proceso se denomina sumación espacial.

El impulso nervioso genera una única contracción siempre y cuando su amplitud sobrepase el umbral. En este caso se cumple la ley del todo o nada, todas las fibras de la unidad motora que se estimula por encima de su umbral se contraen al máximo de intensidad. En el músculo, lo normal es que haya una mayor cantidad de UM con umbrales de reclutamiento bajos y una poca cantidad con umbrales altos (Fuglevand *et al.*, 1993).

La segunda estrategia para aumentar la fuerza requerida es la sumación temporal de respuestas. Un único estímulo provoca una respuesta de sacudida (“*twitch*”) y estímulos repetidos causan un aumento de la fuerza. Cuando la fibra muscular se estimula con más de un pulso de manera repetitiva, éste responde con contracciones repetidas. En el caso de que el músculo no pueda relajarse entre un estímulo u otro, hará que sume la respuesta actual a la anterior, aumentando la fuerza. Con la repetición de estímulos, el mecanismo de contracción se produce sin que haya relajación alguna, en este caso, hay un máximo de Ca^{2+} en el citosol y un máximo número de puentes cruzados entre la miosina y la actina, esta situación se conoce como tétanos o contracción tetánica (José López Chicharro, 2006).

Tipos de acción muscular

La tensión se produce durante la activación o contracción del músculo que tiene lugar cuando llega al músculo un impulso nervioso, se libera energía y se produce el solapamiento de los filamentos de actina y miosina, acortando el sarcómero. Esta activación siempre tiende a provocar acortamiento pero, en función de la voluntad del sujeto o la relación que se establezca con las resistencias externas, podemos encontrar tres tipos de acciones (Figura 8):

- Acortamiento o acción dinámica concéntrica: superación de la resistencia externa, la fuerza ejercida es capaz de mover la carga.
- Alargamiento o acción dinámica excéntrica: cesión ante la resistencia externa, la carga es mayor que la fuerza ejercida.
- Mantenimiento de la longitud o acción isométrica: la fuerza muscular es equivalente a la carga externa.

En este estudio, se han realizado barridos para encontrar la longitud óptima del músculo en cada experiencia para obtener la máxima fuerza posible



Figura 8: Tipos de acción muscular.

La fuerza que puede llegar a ejercer el músculo depende de muchos factores, a continuación se explica su interacción con dos de los más importantes: la longitud y la velocidad.

Relación longitud-tensión

El mecanismo intrínseco para la generación de fuerza es el deslizamiento de los filamentos ligeros sobre los filamentos pesados, lo que permite el acercamiento de las líneas Z. La energía necesaria para este proceso se obtiene de la hidrólisis del ATP por la ATPasa de la cabeza de la miosina que se produce de manera cíclica en un proceso denominado ciclo de los puentes cruzados, que se ha explicado anteriormente. De acuerdo con esto, el grado de fuerza ejercida por el músculo, depende del número de puentes cruzados activos en un momento dado (a mayor fuerza, más puentes cruzados). Si la longitud del sarcómero se modifica, también cambia el solapamiento de actina y miosina provocando cambios en el número de sitios activos de los filamentos de actina que pueden entrar en contacto con la miosina. Estos cambios en el número potencial de puentes cruzados, provocan que la tensión ejercida por el músculo esté influenciada por la longitud del sarcómero (Huxley, 1966; Enoka, 2002; González-Badillo JJ., 2002). Por lo tanto, hay una longitud óptima en la que el músculo ejerce la fuerza máxima (Figura 9).

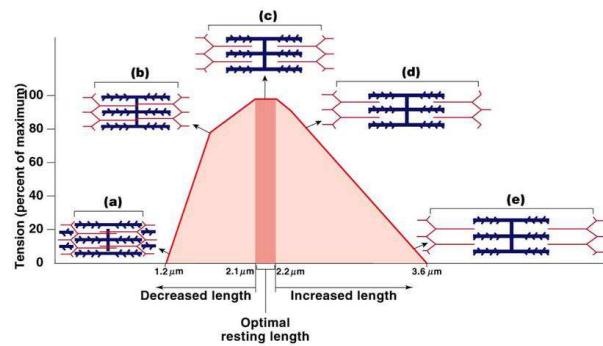


Figura 9: Relación longitud-tensión.

Relación fuerza-velocidad

La capacidad para desarrollar fuerza depende también de la velocidad de acción del músculo. La velocidad con la que se acorta un músculo va a depender de la carga que tiene que mover. A mayor carga, la tensión que hay que hacer es mayor y, como

es lógico, la velocidad a la que se acorte el músculo será menor. Durante las acciones concéntricas, el desarrollo de la fuerza máxima decrece progresivamente a velocidades más altas (cuando levantamos un objeto muy pesado, lo hacemos lentamente, maximizando la fuerza que vamos a realizar). Sin embargo, las acciones excéntricas rápidas permiten la aplicación máxima de la fuerza (José López Chicharro, 2006)

Tipos de fibras musculares

Existen diferentes tipos de fibras musculares según sus características morfológicas y funcionales. El tipo de fibras predominante en un músculo influye, como es lógico, en su fuerza de contracción, su velocidad máxima y su resistencia a la fatiga (Bodine *et al.*, 1987; Bottinelli *et al.*, 1991; Lutz and Lieber, 2002). Los diferentes tipos de fibras se encuentran en diferente proporción en cada músculo atendiendo a la función que éste ha de realizar. Las fibras musculares se han clasificado a lo largo del tiempo en función de su velocidad contráctil, la expresión de la cadena pesada de la miosina y su capacidad metabólica.

A nivel morfológico, como se ha comentado antes, la molécula de miosina está compuesta por seis cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas que se enrollan entre sí en espiral y cuatro cadenas ligeras. Las diferentes isoformas de las cadenas pesadas son las que determinan la diferencia de las fibras a nivel morfológico, lo que revierte en una diferencia funcional a nivel de la velocidad de actuación de la ATPasa de la cabeza de la miosina. En general, se considera que en los músculos de los mamíferos adultos pueden estar presentes, agrupadas en grandes grupos, cuatro isoformas de la cadena pesada de la miosina; un isoforma lenta (MHC_I) y tres isoformas rápidas (MHC_{IIa}, MHC_{IIx}, MHC_{IIb}).

La nomenclatura clásica, propuesta por Brooke y Kaiser en 1970, está basada en la tinción histoquímica de la ATPasa de la cabeza de la miosina, clasificando a las fibras en lentas (tipo I) y rápidas (tipo II), con subtipos: IIa, IId, IIb) en base a patrones de tinción histológica. Basándose en la evidencia inmunohistoquímica, se

ha visto que hay una alta relación entre la clasificación histológica en tipos I, IIA y IIB y la expresión de las diferentes isoformas de la cadena pesada de la miosina (Schiaffino *et al.*, 1989; Termin *et al.*, 1989a; Rivero *et al.*, 1998). Actualmente, los métodos utilizados en la diferenciación de fibras son la histoquímica, la inmunología y la electroforesis. Hoy en día, también se considera la existencia de fibras híbridas, que expresan más de una isoforma de la cadena pesada de la miosina y se ha comprobado experimentalmente que existe la posibilidad de que se produzcan transiciones fibrilares en función de las necesidades mecánicas a las que está sometido el músculo (Termin *et al.*, 1989b; Pette and Staron, 2000).

Los distintos tipos y subtipos de fibras, además de diferenciarse en el plano morfológico y en la velocidad de contracción, presentan diferencias en el tamaño (de más pequeña a más grande: I<IIA<IIX<IIB) y también se observan diferencias en la capacidad metabólica, capacidad de almacenamiento de calcio, etc.

A nivel metabólico, en numerosos trabajos se ha estudiado, en especial, la actividad ATPasa de la cabeza de la miosina pero también la actividad de la Succinato Deshidrogenasa, la Lactato Deshidrogenasa, la Citrato sintasa, la Glicerofosfato deshidrogenasa, etc. (Schiaffino *et al.*, 1970; Pullen, 1977; Delp and Duan, 1996; Rivero *et al.*, 1998; Tasić *et al.*, 2011), todas ellas relacionadas con los diferentes tipos de metabolismo predominantes en las diferentes fibras (anaeróbico, aerobio, etc.) (Tabla 1).

Las fibras rápidas, o de tipo II, están inervadas por motoneuronas capaces de transmitir a altas frecuencias y a gran velocidad. Como resultado, estas fibras son capaces de contraerse rápidamente pero pueden mantener la tensión poco tiempo (Bottinelli *et al.*, 1991) (Figura 10). Esta mayor velocidad de acción podría explicarse porque estas fibras rápidas tienen un retículo sarcoplásmico más desarrollado que las fibras lentas, siendo más propenso a la liberación del calcio cuando se estimula estas fibras. Dentro de este grupo, se encuentran tres subgrupos que se diferencian entre sí en la isoforma de la miosina que presentan y, por lo tanto, en su velocidad

Tipos de fibras humanas por ensayo histoquímico			
Tipo de fibra	Actividad ATPasa (rápida o lenta)	Actividad SDH	Actividad α -GPD
Fibras rápidas glicolíticas	alta	baja	alta
Fibras rápidas oxidativas glicolíticas	alta	alta	alta
Fibras lentas oxidativas	baja	alta	baja

Tabla 1: Tabla de enzimas en relación al tipo de fibras (Victor L. Katch, 2006).

de contracción. En general, las fibras IIB serían las más rápidas, las IIA serían las más lentas dentro de las rápidas y las IID presentarían una actividad intermedia. Estos tipos de fibras se corresponden con las isoformas de la cadena pesada de la miosina: MHCIIIB, MHCIIIA y MHCIID, respectivamente. Numerosos trabajos han confirmado que las fibras rápidas (tipo II) presentan una actividad ATPasa de alta velocidad, mayor en las fibras IIB, intermedio en las fibras IID y el más lento en las fibras IIA (Rivero *et al.*, 1998).

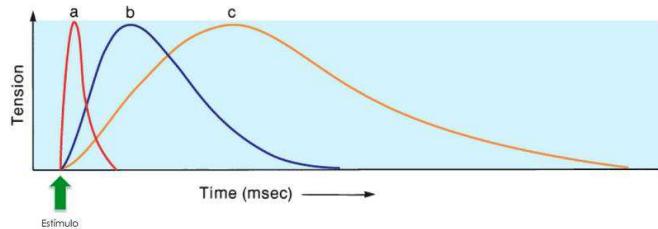


Figura 10: Imagen que ilustra la diferencia entre los distintos tipos de fibras, tanto a nivel de fuerza como de tiempo de mantenimiento de la misma.

La actividad de estas fibras rápidas se basa en sistemas glicolíticos, lo que explica que los músculos con predominancia de fibras rápidas sean aquellos que requieren una respuesta rápida con un nivel alto de fuerza, utilizando un metabolismo anaerobio. Dentro de los subtipos de fibras rápidas, las de tipo IIB son las que presentan una mayor capacidad glucolítica anaerobia y menor oxidativa mientras que las IIA, presentan mayor capacidad oxidativa que glucolítica anaerobia. La capacidad de las

fibras tipo IID se encontraría entre las IIA y las IIB. Otra nomenclatura, relacionada con el tipo de metabolismo, denomina fibras glucolíticas oxidativas rápidas o FOG las de tipo IIA y fibras glucolíticas rápidas o FG a las de tipo IIB (Tabla 2).

Las fibras lentas (de tipo I) están inervadas por motoneuronas que transmiten a frecuencias y velocidades más bajas, pueden mantener una tensión menor durante más tiempo (Figura 10). Presentan una actividad de ATPasa que es la de menor velocidad máxima (son las que más despacio hidrolizan el ATP para contraerse) y están adaptadas para la obtención de energía aerobia gracias a la actividad de enzimas oxidativas. Esta necesidad de oxígeno, se les aporta por medio de numerosos capilares, que son los que dan el tono rojizo a los músculos con predominancia de este tipo de fibras (Figura 11). Estas fibras se han llamado SO, por su lenta velocidad de contracción y su metabolismo oxidativo (Tabla 2).

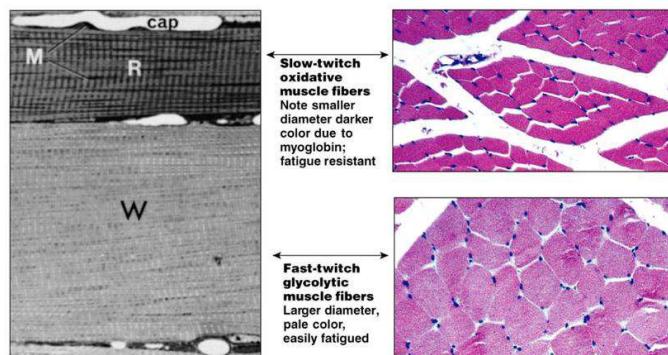


Figura 11: Imagen histológica que diferencia entre las fibras lentas (tipo I) y las fibras rápidas (tipo II).

Por lo tanto, a nivel metabólico, en el citoplasma de las células musculares que forman las fibras rápidas encontramos una mayor concentración de enzimas glucolíticas anaeróbicas (Ej. Lactato Deshidrogenasa), mientras que en las fibras lentas encontramos un mayor número de enzimas oxidativas (Ej. Succinato Deshidrogenasa, Citrato Sintasa).

También se han estudiado las diferencias de inervación en los diferentes tipos de

	Fibras lentas oxidativas	Fibras rápidas oxidativas glicolíticas	Fibras rápidas glicolíticas
Velocidad para alcanzar la máxima tensión	lenta	intermedia	rápida
Actividad miosina ATPasa	lenta	rápida	rápida
Diámetro	pequeño	medio	grande
Duración de la contracción	larga	corta	corta
Actividad de la Ca^{2+}-ATPasa en el RS	moderada	alta	alta
Resistencia	resistente a la fatiga	resistente a la fatiga	fácilmente fatigable
Uso	oxidativa, aeróbica	glicolítica con incremento del comportamiento oxidativo con el entrenamiento	glicolítica más anaeróbica

Tabla 2: Características de los tipos de fibra muscular (Victor L. Katch, 2006).

fibras. Se ha visto que una neurona motora puede inervar de 10 a 180 fibras lentas o de 300 a 800 fibras rápidas, así pues, la diferencia en el desarrollo de la fuerza en las unidades motoras no depende de cada fibra si no en el número de ellas que se activa a partir de una única neurona.

En este trabajo, y con el objetivo de estudiar la influencia del tipo de fibra en el comportamiento mecánico de los músculos, se ha trabajado con el músculo Tibial Anterior (TA), el músculo Extensor Largo de los dedos (EDL) y el músculo Sóleo. Numerosos autores (Eng *et al.*, 2008; Ariano *et al.*, 1973; Schiaffino *et al.*, 1970; Pullen, 1977) han estudiado estos músculos para determinar su composición de fibras. Los trabajos difieren en función del método utilizado para su determinación, en un comienzo fue la histología, la tinción histoquímica de la ATPasa y a lo largo de los años se ha llegado hasta la inmunofluorescencia (Bloemberg and Quadrilatero, 2012), lo que ha permitido acercarse más a la composición exacta.

En un principio, se consideró que el músculo EDL sólo tenía fibras rápidas, algo que se ha ido modificando a lo largo de los años y, actualmente, se considera que el EDL es un músculo que presenta una proporción de fibras mixta (tipo IIA, IIB e incluso I). El Sóleo, que es un músculo anti gravitatorio, siempre se ha considerado un músculo con predominancia de fibras lentas, igual que otros músculos que también ejercen este tipo de función. El TA se clasifica como músculo rápido, con una proporción alta de fibras rápidas. En estos músculos se buscan los valores de fuerza durante la contracción isométrica y para ello, como se ha comentado anteriormente, es necesario encontrar la longitud óptima en reposo de cada músculo antes de comenzar con los ensayos.

3.2. Modelos computacionales

La mayoría de los modelos matemáticos propuestos para la simulación del comportamiento mecánico del músculo esquelético se basan en los modelos matemáticos desarrollados por Hill (Blemker *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2000) y algunos en los modelos de Huxley (Gielen *et al.*, 2000; Oomens *et al.*, 2003). En el primer caso, el modelo se basa en el fenómeno de la contracción en un músculo completo, deducido por una relación termodinámica que se deriva de las mediciones de fuerza-velocidad del músculo. En el segundo caso, el modelo representa la fuerza causada por el deslizamiento de la actina sobre la miosina y a la propiedad de acoplamiento entre ellas. Es decir, el modelo de Hill sería un modelo macroscópico, en el que se tienen en cuenta las propiedades biomecánicas del músculo con parámetros que pueden medirse a nivel macroscópico mientras que el modelo de Huxley se centra en la composición microscópica del músculo.

Se han planteado modelos matemáticos con diferente grado de complejidad de acuerdo al objetivo del estudio que se quiera realizar. Si el interés de la investigación radica en conocer el efecto de los músculos sobre el sistema esquelético para producir movimientos articulares, será suficiente el uso de modelos fenomenológicos unidimensionales (Delp *et al.*, 1990). Sin embargo, si el objetivo está relacionado con

las propiedades internas del músculo, como el efecto de la dirección de las fibras en la distribución de fuerza sobre el músculo (Sharafi and Blemker, 2010), la predicción del comportamiento ante diferentes cargas (Röhrle and Pullan, 2007; Chang *et al.*, 2009), o encontrar la causa mecánica de lesiones (Ingwall *et al.*, 1975; Grefte *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010) se utilizan modelos metodológicos 2D o 3D que consideran la estructura completa del músculo.

Otros modelos computacionales están interesados en el comportamiento del tejido desde el punto de vista mecánico, en estos casos, los modelos que consideran geometrías 3D se hacen más próximos a la realidad. La mayor parte de los modelos constituidos en el marco de la mecánica del continuo, utilizan una descomposición aditiva de la función densidad de energía de deformación entre la tensión activa y pasiva basados en el modelo de los tres elementos propuesto por Hill. Un modelo consistente, extendido a la formulación continua fue presentado por Martins *et al.* (1998). Otros autores enriquecen el modelo constitutivo incorporando las tensiones en la dirección de la fibra (Blemker *et al.*, 2005; Jenkyn *et al.*, 2002; Johansson *et al.*, 2000). Otros modelos consideran el tipo de fibras presente en el músculo (Böl and Reese, 2008; Yucesoy *et al.*, 2002; Lemos *et al.*, 2004).

El efecto mecánico de la contracción muscular se deduce con los modelos mecánicos de Hill o Huxley pero la activación se inicia con el envío de la señal cerebral en un proceso completo denominado “excitación-contracción”. Para la simulación completa de este fenómeno, hay que tener en cuenta el flujo de sustancias químicas y la circulación de corriente de la célula. Por lo tanto, un modelo muscular completo con opción a ser utilizado en el campo médico, requiere clarificar la conexión entre la señal enviada por el cerebro, el flujo electro-químico y la acción de fuerza en el músculo (Fuglevand *et al.*, 1993; Konishi and Watanabe, 1998). Para esclarecer el proceso molecular de la contracción se requiere un modelo biológico (Huxley and Niedergerke, 1954) o iónico (Rudy, 2001).

4. Material y Métodos

4.1. Dispositivo experimental

El estudio ha sido realizado en 15 ratas macho de raza Wistar de dos meses de edad con un peso de $313 \pm 81,14$ g. Los animales se han mantenido en una habitación con la temperatura controlada $22 \pm 1^\circ C$ con ciclos de doce horas de luz y doce de oscuridad, con acceso libre al agua y a la comida. Estos animales proceden de los Laboratorios Harlam.

Estas 15 ratas se distribuyeron en tres grupos diferentes ($n=5$) para estudiar los músculos: Tibialis Anterior (TA), Extensor Digitorum Longus (EDL) y el Sóleo. En todos los animales se escogieron los músculos de la pata derecha.

Para el desarrollo del experimento, las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de Pentobarbital Sódico ($30mg/kg$). Después de las experiencias, se sacrificaron los animales con una sobredosis de Pentobarbital Sódico.

Todos los experimentos han sido aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Zaragoza para el uso de animales de experimentación.

Preparación de los músculos *In situ*

En el primer grupo de animales, se ensayó el músculo TA. Para conseguir su aislamiento, se realizó una incisión desde el tobillo hasta la mitad de la rodilla. La fascia se eliminó completamente y el tendón distal del TA se cortó, de manera que el músculo TA quedó libre, únicamente unido por su tendón proximal. Para realizar las mediciones en la máquina de ensayos, se pegaron dos pequeños trozos de papel de lija a ambos lados del tendón distal. También se dibujaron dos puntos en el extremo proximal y el distal para poder medir la longitud del músculo antes y después de cortar el tendón distal, con el objetivo de conocer su deformación inicial (Figura 12)

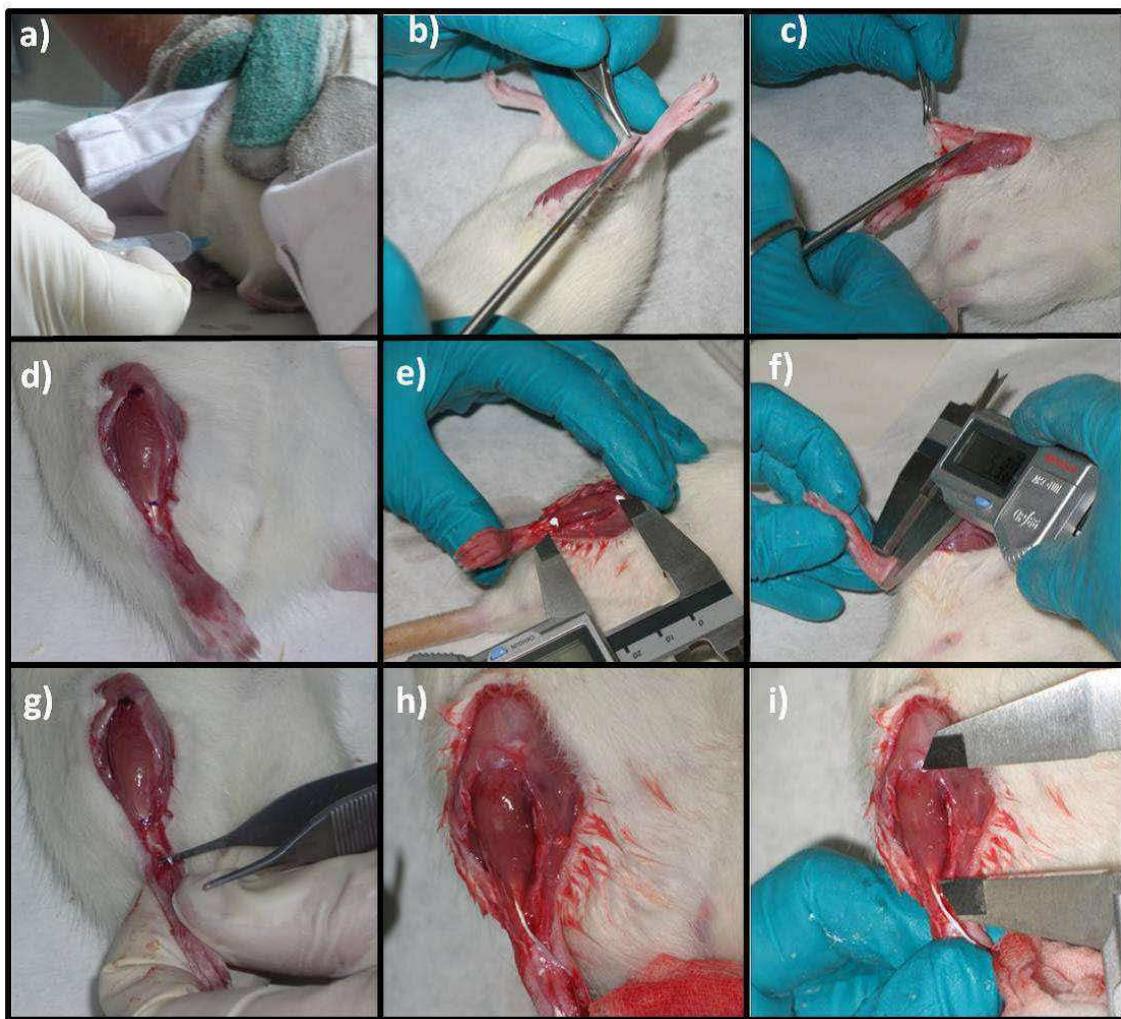


Figura 12: Disección del músculo TA paso a paso

En el caso del EDL, se realizó igualmente una incisión desde el tobillo hasta la mitad de la rodilla. El tendón distal del TA, a la vista después de quitar la fascia, se cortó, lo que permitió levantar el TA y acceder al músculo EDL. Una vez localizado, el tendón distal del EDL fue cortado y se pegaron dos trozo de lija, tal y como se hizo en el caso del TA. Como se hizo con el TA, también se procedió a la medida del músculo antes y después de cortar.

En el caso del Sóleo, la incisión se realizó desde la planta de la pata hasta la parte posterior de la rodilla. Se aisló el tendón de Aquiles cortándolo a nivel del calcáneo. Posteriormente, el tendón del Gastrocnemio se separó del tendón del Sóleo y se cortó. Hay una fina fascia entre ambos músculos (Gastrocnemio y Sóleo) que fue

retirada para evitar que las posibles contracciones del Gastrocnemio durante el experimento, interfirieran en los resultados. Por supuesto, los vasos se preservaron al máximo posible para asegurar el aporte sanguíneo al músculo Sóleo, de igual manera que se realizó para los músculos anteriormente explicados. Después, el tendón distal del Sóleo se cortó y se le pegaron los trozos de lija. También se midió el músculo como se describe más arriba.

El nervio Ciático se visualizó y se le colocó un electrodo a su alrededor. El electrodo consiste en dos conectores que rodeaban el músculo para maximizar su área de contacto.



Figura 13: Posición del músculo EDL, TA y Sóleo en la máquina de ensayos.

Para el desarrollo de esta técnica se diseñó una plataforma de metacrilato en la que el animal se coloca en decúbito supino para el EDL y el TA y decúbito prono para el caso del Sóleo, con la rodilla derecha perfectamente sujetada, lo que permite garantizar la correcta posición del músculo en la máquina (Figura 13). Todos los experimentos se realizaron en una máquina de ensayos INSTRON 5548, equipada con una célula de 10N (Figura 14)

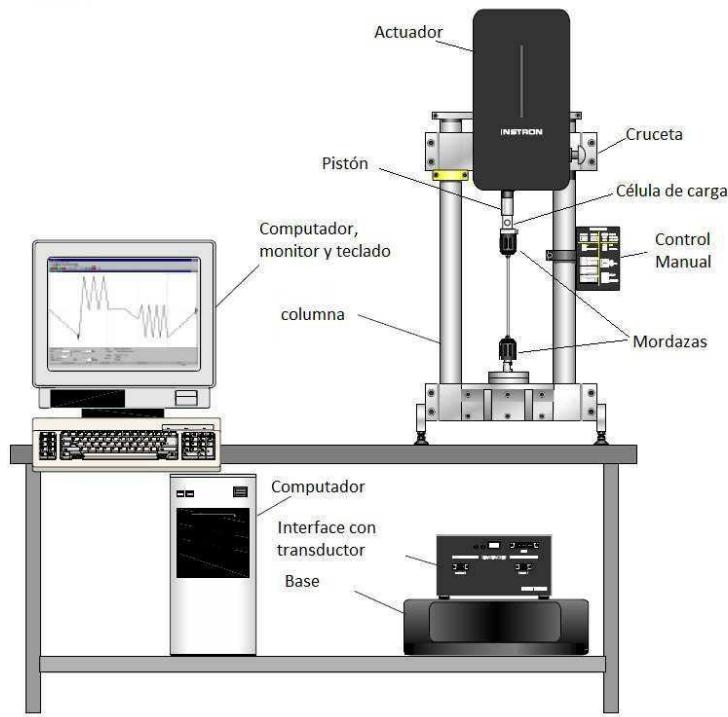


Figura 14: Máquina Instron. Tomada y modificada de Instron Corporation 2000

Protocolo de estimulación

Para realizar la estimulación de los diferentes músculos, se utilizó un generador de señal eléctrica CIBERTEC CS-20 (Figura 15). Con el protocolo de estimulación lo que se pretendía era que el músculo alcanzara la máxima fuerza a la longitud óptima, obteniendo una contracción tetánica.



Figura 15: Generador de señal eléctrica CIBERTEC CS-20

Para determinar el protocolo de estimulación adecuado, en primer lugar se realizaron experiencias en las que se daba al animal estímulos de un único pulso a un voltaje fijo, variando la duración del pulso (curva twitch). Una vez que el tiempo del estímulo ha sido determinado, se envían trenes de pulsos durante un segundo haciendo un barrido de frecuencias, de 10Hz a 100Hz. Se obtienen la frecuencia óptima (90Hz) y se estimula a esta frecuencia durante un segundo haciendo barridos de voltaje de la señal desde 2V a 10V.

Una vez que el protocolo de estimulación queda fijado como 90Hz, 8V, 1ms, 10 s, para llevar a cabo el ensayo, es necesario determinar la longitud óptima del músculo (aquella en la que ejerce la máxima fuerza). Para ello y con un único pulso, se varía la longitud del músculo hasta encontrar la óptima.

Después de cada experiencia, los músculos se retiraron y se midió su peso y su volumen.

Análisis estadísticos

Con el objetivo de comprobar la significación de los resultados obtenidos en los ensayos experimentales, se llevó a cabo un análisis estadístico. Los resultados de estos análisis se expresan como +/- su error estándar. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un test Scheffe. Un resultado es considerado significativo cuando $p < 0,05$, mientras que si el p-valor está entre 0,05 y 0,10, lo clasificamos como tendencia.

4.2. Modelos de simulación computacional

Tradicionalmente, la fuerza total desarrollada por el músculo ha sido formulada como la suma de su contribución activa y pasiva (Blemker *et al.*, 2005; BöI and Reese, 2008). De esta manera, la fuerza total puede escribirse como:

$$F_{\text{Músculo}} = F_{\text{pasiva}} + F_{\text{activa}} \quad (1)$$

La fuerza pasiva F_{pasiva} es la fuerza con la que se opone el músculo a un estiramiento o compresión sin estímulo. La respuesta pasiva del tejido suele formularse a través de relaciones de comportamiento en grandes deformaciones bajo los denominados modelos de comportamiento hiperelásticos (Böl and Reese, 2008; Calvo *et al.*, 2010)

La fuerza activa F_{activa} ejercida por el músculo, puede expresarse como una serie de relaciones que escalan en mayor o menor medida, la denominada fuerza isométrica máxima. El número de estas relaciones puede incrementarse con la complejidad del modelo, por ejemplo, teniendo en cuenta parámetros de tipo químico además de los fundamentalmente mecánicas (i. e. nivel de glúcogeno y ATP en el músculo). En trabajos futuros, se pretende introducir en los modelos la relación existente entre los niveles de reservas energéticas y la fuerza ejercida por el músculo.

El modelo aquí propuesto para la fuerza activa se expresa como el producto entre la fuerza isométrica máxima y una serie de factores adimensionales tomando valores entre cero y uno. Estos factores se obtienen de la relación fuerza-longitud y otros englobados dentro de la dependencia entre la fuerza y la señal de activación. Mientras esta fuerza se observa experimentalmente a nivel macroscópico, con el modelo propuesto, se introducen fenómenos que tienen su origen a nivel microscópico (nivel de solapamiento de los filamentos de actina y miosina). De esta forma, la fuerza activa puede expresarse como:

$$F_{\text{activa}} = F_0 f_\lambda f_\alpha \quad (2)$$

La función f_α que define la relación entre la fuerza y la señal de activación, describe el acoplamiento excitación-contracción y depende de las propiedades de la señal eléctrica, como el voltaje, la frecuencia y la respuesta característica intrínseca de las fibras. Se considera pues una relación multiplicativa para esta función resultando:

$$F_{\text{activa}} = F_0 f_\lambda f_V f_t \quad (3)$$

Las expresiones que definen estas funciones se muestran a continuación.

Relación fuerza-longitud

Se sabe que el músculo ejerce su máxima fuerza cuando se encuentra en una longitud denominada óptima. Se han propuesto numerosas relaciones para recoger este efecto entre el estiramiento presente en el músculo y la fuerza. Por ejemplo, Blemker *et al.* (2005) describen la relación fuerza-longitud como una definida a tramos. Böll and Reese (2008) proponen una función suave, utilizando una constante adimensional, denominada alargamiento (λ), que se define como el cociente entre las longitudes final (estirado/comprimido) e inicial (músculo en reposo). El alargamiento óptimo del músculo, en el que éste desarrolla su fuerza máxima se representa como λ_{opt} .

La relación que utiliza el modelo matemático adoptado en este trabajo, es la propuesta por Ramírez *et al.* (2010) que hace uso de una función sigmoidal que presenta una mejor adaptación a los resultados experimentales:

$$f_\lambda = e^{\left(\frac{-(\lambda - \lambda_{\text{opt}})^2}{2(1-\beta)^2}\right)} \quad (4)$$

Puesto que los ensayos experimentales han sido llevados a cabo bajo contracciones isométricas a la longitud en la que ejerce la máxima fuerza, se tiene que $\lambda = \lambda_{\text{opt}}$ con lo que $f_\lambda = 1$.

Relación fuerza-voltaje

El reclutamiento de las fibras se realizó con una señal eléctrica aplicada en el nervio, descrita en el apartado experimental. Incrementando la amplitud de esta señal (voltaje) se consigue un mayor reclutamiento de las fibras hasta conseguir la activación de todo el músculo. Este efecto puede recogerse utilizando la siguiente relación para amplitudes de la señal mayores de 2 V:

$$f_V = 1 - e^{(a-V)/d} \quad V \geq 2 \quad (5)$$

Donde a es el punto de corte con el eje de ordenadas y d controla la curvatura. Los parámetros que ajustan los datos experimentales, son $a = 1,609$ y $d = 1,4737$. Como se ha comentado, los músculos en los ensayos se estimulan para que realicen su fuerza isométrica máxima, con lo cual, el voltaje de la señal utilizado es aquel que maximiza esta relación. Este voltaje se ha tomado como $V = 8 V$ que resulta en $f_V = 1$.

Relación fuerza-tiempo

Si el estímulo es un único pulso, la unidad motora responde con una contracción caracterizada por sólo dos parámetros: la amplitud de la contracción (P) y el tiempo de contracción (T_c) (Fuglevand *et al.*, 1993). Al considerar todo el músculo bajo el estímulo de un único pulso, se define un tiempo de contracción aparente T'_c que representa el tiempo que se tarda en llegar a la fuerza máxima. Esta suposición implica que el tiempo medio de contracción de todas las unidades motoras, es el mismo. La amplitud aparente de la fuerza P' se define como el pico de fuerza alcanzado en T'_c , suponiendo una contracción isométrica ideal. La función f_{pulso} que representa esta contracción aparente puede expresarse como:

$$f_{\text{pulso}}(P', T'_c, t) = \frac{P't}{T'_c} e^{1-(\frac{t}{T'_c})} \quad (6)$$

P' y T'_c se determinan a partir de los datos experimentales.

Cuando en lugar de un único pulso, se aplica un tren de pulsos a una determinada frecuencia, las contracciones de las unidades motoras se suman de manera no lineal (Fuglevand *et al.*, 1993). Cuando el pulso de frecuencias es suficientemente alto, se alcanza una zona de meseta en la relación fuerza-tiempo (Figura 16). Es en esta situación, cuando no se distingue la oscilación de la carga en la respuesta del músculo, cuando se dice que se ha alcanzado el tétanos.

Tomando el músculo como una unidad, la fuerza total se obtiene por la sumación de los pulsos de respuesta dependientes del tiempo de intervalo del estímulo Δ_{stim} . Este parámetro representa el intervalo de tiempo entre dos pulsos y es, en realidad, la inversa de la frecuencia. La función f_{tren} que representa la sumación de las contracciones de todas las unidades motoras es:

$$f_{\text{tren}} = \sum_{i=1}^n P' \frac{t - \Delta_{\text{stim}}(i)}{T'_c} e^{\left(1 - \left(\frac{t - \Delta_{\text{stim}}(i)}{T'_c}\right)\right)} f_{fr} \quad (7)$$

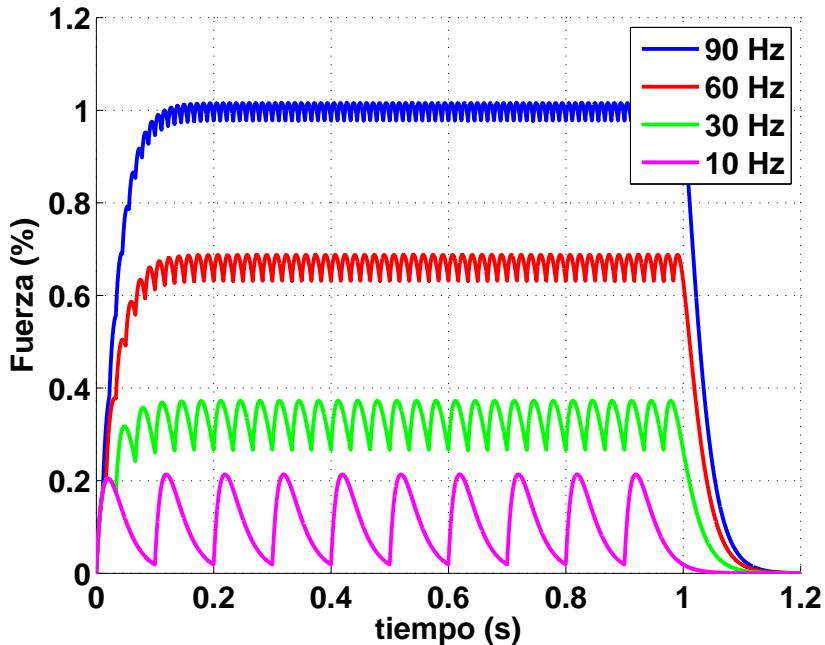


Figura 16: Representación de la función f_{tren} para cuatro valores de la frecuencia de estímulo (90, 60, 30 y 10 Hz).

Donde f_{fr} es:

$$f_{fr} = 1 - r e^{(-fr_{\text{norm}})/c} \quad (8)$$

fr_{norm} es el producto entre la frecuencia fr y el tiempo de contracción, r determina el cociente entre la contracción y la fuerza tetánica, c es la tasa de incremento en la fuerza con el incremento en la frecuencia normalizada y n es el número de pulsos de estímulo.

Para contemplar el fenómeno de la fatiga (caída de la fuerza durante el estímulo mantenido) desde un punto de vista únicamente de intercambio iónico, puede interpretarse como una saturación gradual de los sitios de troponina con el calcio remanente de los sucesivos estímulos. Cannell and Allen (1984) demostraron que la saturación de las células musculares depende de la asociación Ca-calsequestrina. La Calsequestrina es una proteína del retículo sarcoplásmico con una función de almacenamiento de calcio en la forma de ca-calsequestrina. El calcio cae rápidamente durante el impulso y se recupera más lentamente, principalmente debido a la liberación del calcio unido a la calsequestrina. Este efecto puede modelarse por medio de una ecuación de Hill como la relación propuesta por Konishi and Watanabe (1998), para ajustar los datos experimentales de Ca-fuerza.

$$f_{\text{Sat}} = \frac{[A]^h}{[A_m]^h + [A]^h} \quad (9)$$

Donde A es la concentración de una sustancia genérica (no se ha medido ninguna sustancia experimentalmente) en el sarcoplasma. El coeficiente de Hill h es la medida de la pendiente y $[A_m]$ es la concentración de A que da la mitad de la máxima fuerza. La concentración $[A]$ cambia en el tiempo como en Fernandez *et al.* (2005):

$$[A] = [A_0] + ([A_{\max}] - [A_0]) \frac{t - \Delta_{\text{stim}}(i)}{t_{[A_{\max}]}} e^{(1-(t-\Delta_{\text{stim}}(i)))/t_{[A_{\max}]}} \quad (10)$$

$[A_0]$ es el nivel de concentración basal, que por simplicidad se ha tomado igual a 0. $t_{[A_{\max}]}$ es el tiempo en el que se alcanza el valor máximo de $[A_{\max}]$ siendo ésta la máxima concentración de la sustancia.

Finalmente, cogiendo toda la serie de relaciones anteriores la fuerza activa desarrollada por el músculo puede escribirse como:

$$F_{\text{active}} = F_0 f_{\lambda} f_V f_{\text{tren}} f_{\text{Sat}} \quad (11)$$

5. Resultados

Los resultados de la evolución de la fuerza isométrica máxima a lo largo de los 10 s del estímulo, pueden observarse en la Figura 17 para los tres músculos analizados (TA, EDL y Sóleo). En dicha figura se muestra la media y la desviación estándar de las cinco muestras ensayadas.

La Figura 17.d muestra la denominada tasa de fatigabilidad que representa la pendiente (derivada con respecto al tiempo) de las curvas fuerza frente al tiempo de los tres músculos (Figuras 17.a, 17.b y 17.c).

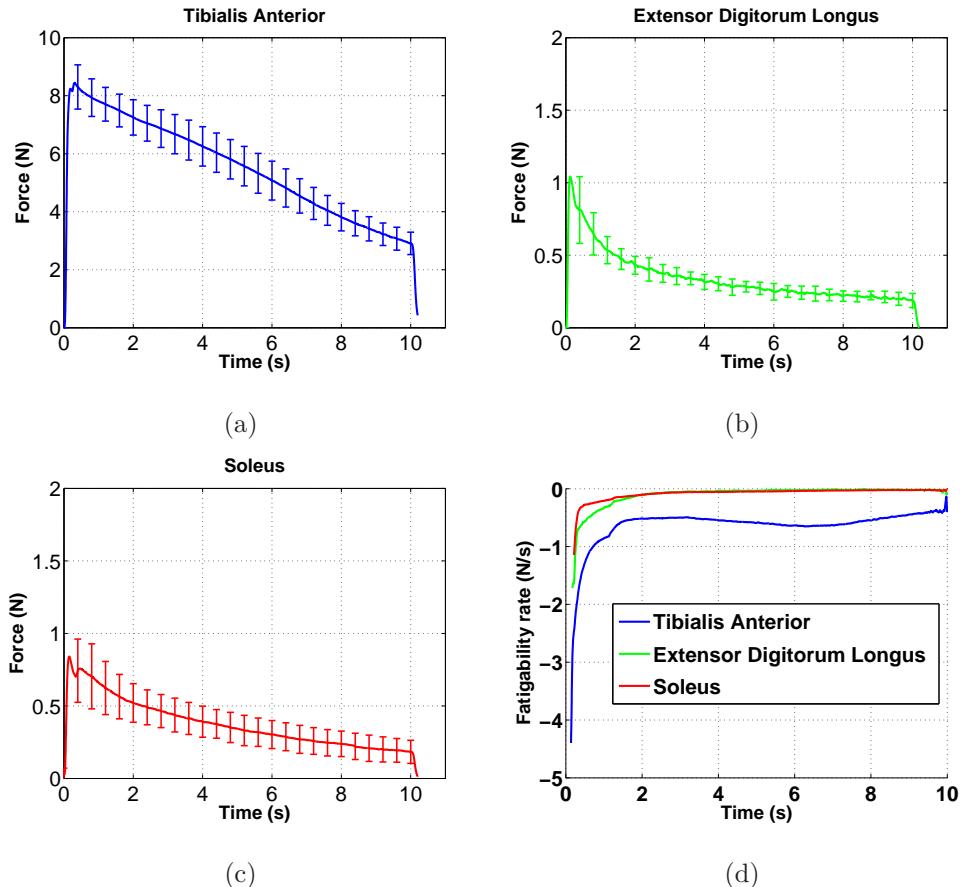


Figura 17: Evolución de la fuerza isométrica en el tiempo para: (a) Músculo TA. (b) Músculo EDL. (c) Músculo Sóleo. (d) Tasa de fatigabilidad para los tres músculos, expresada en N/s .

En el caso del TA (Figura 17.a), el valor máximo promedio de fuerza alcanzado

	TA	EDL	Sóleo
Tiempo para alcanzar F_{\max}	$0,1080 \pm 0,0069$	$0,1150 \pm 0,0319$	$0,1474 \pm 0,0408$
Reducción de fuerza (%)	67,45 %	82,17 %	79,57 %

Tabla 3: Tiempo empleado por los diferentes músculos para alcanzar la fuerza máxima y porcentaje de reducción de esa fuerza al finalizar el estímulo.

es de $8,88 \pm 0,34$ N, en un tiempo de $0,108 \pm 0,0069$ s. El valor de la fuerza cayó, posteriormente hasta un valor de $2,89 \pm 0,38$ N cuando finalizó el estímulo. El peso promedio de los músculos ensayados fue de $0,570 \pm 0,03$ g. Desde el punto de maxima fuerza alcanzada hasta el final de la contraccion, se puede observar una caida uniforme de la fuerza con una pendiente de aproximadamente $-0,5$ N/s (Figura 17.d).

El músculo EDL (Figura17.b) alcanzó una fuerza máxima de $1,06 \pm 0,16$ N en un tiempo de $0,115 \pm 0,0319$ s. Durante el estímulo, se observó una disminucion de la fuerza hasta $0,189 \pm 0,04$ N en el instante en el que se detiene el estímulo. Como se puede observar, el comportamiento del EDL es diferente del TA, apareciendo una gran pendiente inicial durante los dos primeros segundos de contracción para posteriormente suavizarse a un valor de aproximadamente $-0,1$ N/s (Figura 17.d). El peso medio de este músculo fue de $0,165 \pm 0,02$ g.

Por último, en el caso del Sóleo, sus valores máximos de fuerza fueron $0,93 \pm 0,14$ N en un tiempo de $0,147 \pm 0,0408$ s y el valor mínimo de $0,19 \pm 0,07$ N en 10s. La media de su peso fue de $0,193 \pm 0,03$ g. Aunque la velocidad de fatiga del Soleo es similar a la del EDL, su pendiente inicial es menos pronunciada (Figura 17.d).

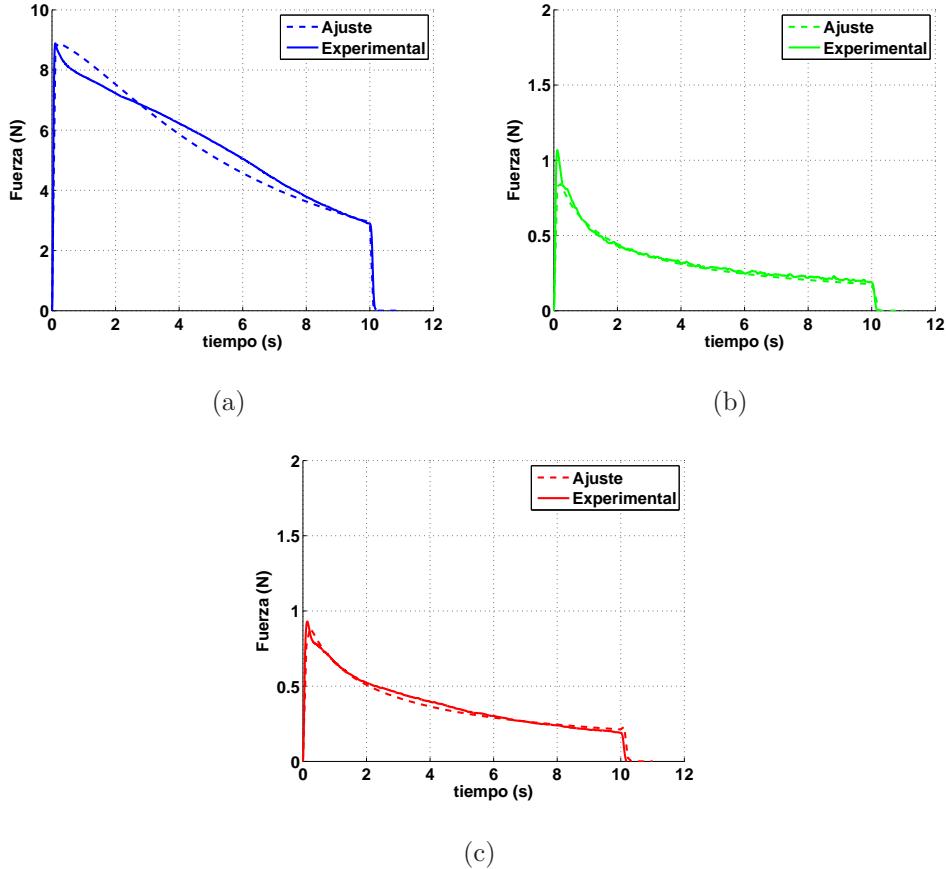


Figura 18: Curvas de ajuste siguiendo el modelo unidimensional propuesto por Ramírez *et al.* (2010): (a) Músculo TA. (b) Músculo EDL. (c) Músculo Sóleo.

La Tabla 3 recoge, a modo de resumen los tiempos empleados por los diferentes músculos para alcanzar la fuerza máxima. Se muestra también la reducción de fuerza, expresada en tanto por ciento, desde el valor máximo hasta el instante en el que se detiene el estímulo.

La Figura 18 muestra, junto con las curvas experimentales, los resultados obtenidos del ajuste de parámetros del modelo de Ramírez *et al.* (2010). En línea discontinua se han representado los ajustes a los resultados experimentales que aparecen en línea continua.

Por último, en la Tabla 5 aparecen los parámetros utilizados para los tres diferentes ajustes.

Tabla 4: Datos de ajuste utilizando el modelo propuesto por Ramírez *et al.*.. (2010)

	TA	EDL	SOLEUS
Fuerza isométrica máxima	$F_0 = 8,88 \text{ N}$	$F_0 = 1,06 \text{ N}$	$F_0 = 0,93$
Relación fuerza-longitud	$\lambda = 1$ $\lambda_{opt} = 1$ $\beta = 0,837$	$\lambda = 1$ $\lambda_{opt} = 1$ $\beta = 0,837$	$\lambda = 1$ $\lambda_{opt} = 1$ $\beta = 0,837$
Relación fuerza-voltaje	$a = 1,609 \text{ V}$ $V = 8 \text{ V}$ $d = 1,474 \text{ V}$	$a = 1,609 \text{ V}$ $V = 8 \text{ V}$ $d = 1,474 \text{ V}$	$a = 1,609 \text{ V}$ $V = 8 \text{ V}$ $d = 1,474 \text{ V}$
Relación fuerza-tiempo	$P' = 0,16 \text{ N}$ $T' = 0,04 \text{ s}$ $fr = 90 \text{ Hz}$ $r = 1,054$ $c = 1,125$ $h = -1,5$ $[A_m] = 4 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{mol}$ $[A_{\max}] = 0,1 - 0,001 \text{ } \mu\text{mol}$	$P' = 0,15 \text{ N}$ $T' = 0,03 \text{ s}$ $fr = 90 \text{ Hz}$ $r = 1,054$ $c = 1,125$ $h = -0,8$ $[A_m] = 5,5 \cdot 10^{-4} \text{ } \mu\text{mol}$ $[A_{\max}] = 0,002 - 0 \text{ } \mu\text{mol}$	$P' = 0,11 \text{ N}$ $T' = 0,04 \text{ s}$ $fr = 90 \text{ Hz}$ $r = 1,054$ $c = 1,125$ $h = -0,8$ $[A_m] = 5,5 \cdot 10^{-4} \text{ } \mu\text{mol}$ $[A_{\max}] = 0,0016 - 0 \text{ } \mu\text{mol}$

6. Discusión

Varios autores han demostrado previamente (Schiaffino *et al.*, 1970; Pullen, 1977; Delp and Duan, 1996; Rivero *et al.*, 1998; Tasić *et al.*, 2011) que la composición de fibras de los tres músculos seleccionados presenta diferencias bioquímicas. Como se ha comentado anteriormente, hoy en día la clasificación del tipo de fibras musculares que predomina en el músculo esquelético de los mamíferos está basada en la expresión de las isoformas de la cadena pesada de la miosina. Los grupos más importantes son: tipo I, IIa, IIx, y IIb. Las isoformas de la cadena pesada de la miosina determinan la velocidad de establecimiento de los puentes cruzados y por lo tanto, la velocidad de acortamiento máxima de una célula muscular, siendo las de tipo I las más lentas, las de tipo IIa intermedias y las de tipo IIx/IIb las más rápidas (Bottinelli and Reggiani, 2000).

La composición de fibras del TA, EDL y Sóleo de rata ha sido investigada en numerosos trabajos, utilizando diferentes métodos de análisis cuantitativo. La mayoría de los trabajos, consideran al TA un músculo compuesto, predominantemente, por fibras rápidas (IIb), mientras que en el Sóleo predominan fibras lentas de tipo (I) y en el caso del EDL, se considera que la mayor parte de él está compuesto tanto por fibras IIa como por fibras IIb (Ariano *et al.*, 1973; Maltin *et al.*, 1989; Staron *et al.*, 1999; Torrella *et al.*, 2000; Soukup *et al.*, 2002; Eng *et al.*, 2008). Esta composición diferente es la base de sus diferencias de funcionamiento. Así, el Sóleo está considerado como un músculo lento mientras que el TA presenta un comportamiento de contracción rápida.

Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en el tiempo de respuesta al estímulo entre los músculos estudiados, sin embargo, se observa una tendencia que indica que el músculo TA alcanza antes la fuerza máxima que el Sóleo ($p < 0,10$). El EDL, que tiene una composición intermedia de fibras, no muestra diferencias significativas al comparar su tiempo de respuesta con el de los otros dos músculos ($p > 0,05$).

La composición de fibras también puede explicar el comportamiento de los músculos durante la estimulación. Las fibras rápidas responden antes de generar más fuerza que las fibras lentas (Rome, 2006), lo que podría explicar por qué en nuestros resultados observamos que la fuerza máxima del TA es mayor que la del Sóleo o el EDL, independientemente de su peso.

La clasificación de los tipos de fibras tiene relevancia en el contexto de los cambios metabólicos producidos durante la fatiga, ya que la isoforma rápida de la cadena pesada de la miosina (Tipo IIb), consume ATP a una velocidad mayor que la isoforma más lenta (Tipo I) (Bruton *et al.*, 2006). Por lo tanto, el alto contenido de fibras tipo IIa en el EDL y de tipo I en el Sóleo, podrían explicar la menor fatigabilidad observada en estos músculos durante su contracción, mostrando un mantenimiento del valor de la fuerza después de los dos primeros segundos de contracción. Por otro lado, el elevado porcentaje de fibras tipo IIb en el músculo TA podría conducir a una fatigabilidad a corto plazo mayor, mostrando una caída constante de la intensidad de la fuerza a lo largo del tiempo.

El esfuerzo realizado para caracterizar las propiedades de fatiga del músculo resulta justificado en el hecho de que existen pocos trabajos que describan los efectos de la fatiga en el músculo esquelético mediante la utilización de modelos matemáticos y, la mayor parte de ellos, están formulados en una sola dimensión (Böl *et al.*, 2011).

En futuros estudios, se podría aumentar el tiempo de estimulación para detectar las diferencias en la resistencia a la fatiga a largo tiempo entre estos músculos. Las fibras lentas tipo I tienen una mayor resistencia a la fatiga que las de tipo II pero esto se debe también a factores diferentes a la isoforma de la cadena pesada de la miosina, como puede ser el metabolismos energético (Allen *et al.*, 2008).

7. Conclusiones

Las conclusiones más relevantes extraídas tras la realización de este trabajo final de máster son las siguientes:

- La composición del músculo en cuanto a tipo de fibras se refiere, determina fuertemente su comportamiento mecánico desde el punto de vista activo y debe ser contemplada para simular la variación de la fuerza en el tiempo.
- El protocolo experimental desarrollado establece una herramienta muy útil para, en un futuro, desarrollar y validar simulaciones computacionales realistas por medio de elementos finitos.
- El ajuste realizado a través del modelo matemático, del comportamiento experimental observado, se adapta perfectamente a la media de los resultados de la evolución de la fuerza para los tres diferentes músculos. Este ajuste, por medio de la evolución en el tiempo de una concentración genérica, permite representar la evolución de la contracción en el tiempo.
- Puesto que toda la experimentación se ha llevado a cabo bajo contracciones isométricas máximas, a la longitud óptima, los parámetros del ajuste de la relación fuerza-alargamiento y fuerza-voltaje se mantienen idénticos para los tres músculos. De esta manera, tras ajustar las variables que recogen la evolución temporal de la contracción en esta situación, se plantean ensayos para caracterizar las relaciones anteriores de los músculos en los que todavía no se ha realizado (EDL y Soleo).
- La técnica experimental desarrollada, permite el mantenimiento de las condiciones fisiológicas del músculo, lo que le da a los resultados un valor añadido por su cercanía a la realidad.

Bibliografía

- Frank I. Katch. Victor L. Katch, William D. McArdle. *Essentials of exercise physiology*. 2006.
- Almudena Fernández Vaquero José López Chicharro. *Fisiología del Ejercicio*. 2006.
- A. Ramírez, J. Grasa, A. Alonso, F. Soteras, R. Osta, M. J. Muñoz, and B. Calvo. Active response of skeletal muscle: in vivo experimental results and model formulation. *Journal of Theoretycal Biology*, 267(4):546–553, 2010.
- B. J. Majors and J. S. Wayne. Development and validation of a computational model for investigation of wrist biomechanics. *Annals of Biomedical Engineering*, 39(11):2807–2815, 2011.
- Ribas JJ. González-Badillo JJ. Programación del entrenamiento de fuerza. *Ed. Indie Publicaciones*, 2002.
- E Henneman. Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science*, 126(3287):1345–7, December 1957. ISSN 0036-8075.
- A. J. Fuglevand, D. A. Winter, and A. E. Patla. Models of recruitment and rate coding organization in motor-unit pools. *Journal of Neurophysiology*, 70(6):2470–2488, 1993.
- H. E. Huxley. The fine structure of striated muscle and its functional significance. *Harvey Lect*, 60:85–118, 1966.
- Roger M. Enoka. Activation order of motor axons in electrically evoked contractions. *Muscle Nerve*, 25(6):763–764, Jun 2002.

- S. C. Bodine, R. R. Roy, E. Eldred, and V. R. Edgerton. Maximal force as a function of anatomical features of motor units in the cat tibialis anterior. *J Neurophysiol*, 57(6):1730–1745, Jun 1987.
- R. Bottinelli, S. Schiaffino, and C. Reggiani. Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J Physiol*, 437:655–672, Jun 1991.
- Gordon J. Lutz and Richard L. Lieber. Studies of myosin isoforms in muscle cells: single cell mechanics and gene transfer. *Clin Orthop Relat Res*, (403 Suppl):S51–S58, Oct 2002.
- S. Schiaffino, L. Gorza, S. Sartore, L. Saggin, S. Ausoni, M. Vianello, K. Gundersen, and T. LÄmo. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil*, 10(3):197–205, Jun 1989.
- A. Termin, R. S. Staron, and D. Pette. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry*, 92(6):453–457, 1989a.
- J. L. Rivero, R. J. Talmadge, and V. R. Edgerton. Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 19(7):733–742, Oct 1998.
- A. Termin, R. S. Staron, and D. Pette. Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles. a single-fiber study. *Eur J Biochem*, 186(3):749–754, Dec 1989b.
- D. Pette and R. S. Staron. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech*, 50(6):500–509, Sep 2000.
- S. Schiaffino, V. HanzlÄkovÄj, and S. Pierobon. Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. *J Cell Biol*, 47(1):107–119, Oct 1970.
- A. H. Pullen. The distribution and relative sized of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. *J Anat*, 123(Pt 2):467–486, 1977.

- M. D. Delp and C. Duan. Composition and size of type i, iia, iid/x, and iib fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol*, 80(1):261–270, Jan 1996.
- D. Tasić, I. Dimov, V. Petrović, T. Savić, and D. Dimov. Fiber type composition and size of fibers in the rat tibialis anterior muscle. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 28(3):161–168, 2011.
- C. M. Eng, L. H. Smallwood, M. P. Rainiero, M. L., S. R. Ward, and R. L. Lieber. Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. *The Journal of Experimental Biology*, 211(Pt 14):2336–2345, 2008.
- M. A. Ariano, R. B. Armstrong, and V. R. Edgerton. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 21(1):51–55, 1973.
- Darin Bloemberg and Joe Quadrilatero. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS One*, 7(4):e35273, 2012.
- Silvia S. Blemker, Peter M. Pinsky, and Scott L. Delp. A 3d model of muscle reveals the causes of nonuniform strains in the biceps brachii. *Journal of Biomechanics*, 38(4):657–665, Apr 2005.
- T. Johansson, P. Meier, and R. Blickhan. A finite-element model for the mechanical analysis of skeletal muscles. *Journal of Theoretical Biology*, 206(1):131–149, 2000.
- A. W. J. Gielen, C. W. J. Oomens, P. H. M. Bovendeerd, T. Arts, and J. D. Janssen. A finite element approach for skeletal muscle using a distributed moment model of contraction. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 3(3):231–244, 2000.
- C. W. Oomens, M. Maenhout, C. H. van Oijen, M. R. Drost, and F. P. Baaijens. Finite element modelling of contracting skeletal muscle. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences*, 358:1437–1453, 2003.

- S. L. Delp, J. P. Loan, M. G. Hoy, F. E. Zajac, E. L. Topp, and J. M. Rosen. An interactive graphics-based model of the lower extremity to study orthopaedic surgical procedures. *IEEE Trans Biomed Eng*, 37(8):757–767, Aug 1990.
- Bahar Sharafi and Silvia S. Blemker. A micromechanical model of skeletal muscle to explore the effects of fiber and fascicle geometry. *J Biomech*, 43(16):3207–3213, Dec 2010.
- O. Röhrle and A. J. Pullan. Three-dimensional finite element modelling of muscle forces during mastication. *Journal of Biomechanics*, 40(15):3363–72, 2007.
- C. Y. Chang, J. D. Rupp, M. P. Reed, R. E. Hughes, and L. W. Schneider. Predicting the effects of muscle activation on knee, thigh, and hip injuries in frontal crashes using a finite-element model with muscle forces from subject testing and musculoskeletal modeling. *Stapp Car Crash Journal*, 53:291–328, 2009.
- J. S. Ingwall, M. DeLuca, H. D. Sybers, and K. Wildenthal. Fetal mouse hearts: a model for studying ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(7):2809–13, 1975.
- S. Grefte, A. M. Kuijpers-Jagtman, R. Torensma, and J. W. Von den Hoff. A model for muscle regeneration around fibrotic lesions in recurrent strain injuries. *Medicine and science in sports and exercise*, 42(4):633–834, 2009.
- D. Ito, E. Tanaka, and S. Yamamoto. A novel constitutive model of skeletal muscle taking into account anisotropic damage. *J Mech Behav Biomed Mater*, 3(1):85–93, Jan 2010.
- J. A. C. Martins, E. B. Pires, R. Salvado, and P. B. Dinis. A numerical model of passive and active behavior of skeletal muscles. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 151:419–433, 1998.
- T. R. Jenkyn, B. Koopman, P. Huijing, R. L. Lieber, and K. R. Kaufman. Finite element model of intramuscular pressure during isometric contraction of skeletal muscle. *Physics in Medicine and Biology*, 47(22):4043–4061, 2002.

- Markus BöI and Stefanie Reese. Micromechanical modelling of skeletal muscles based on the finite element method. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 11(5):489–504, Oct 2008.
- C. A. Yucesoy, B. H. Koopman, P. A. Huijing, and H. J. Grootenboer. Three-dimensional finite element modeling of skeletal muscle using a two-domain approach: linked fiber-matrix mesh model. *Journal of Biomechanics*, 35(9):1253–1262, 2002.
- R. R. Lemos, M. Epstein, and W. Herzog. A framework for structured modeling of skeletal muscle. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 7(6):305–317, 2004.
- M. Konishi and M. Watanabe. Steady state relation between cytoplasmic free Ca^{2+} concentration and force in intact frog skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol*, 111(4):505–519, Apr 1998.
- A. F. Huxley and R. Niedergerke. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*, 173(4412):971–973, May 1954.
- Y. Rudy. The ionic mechanisms of conduction in cardiac tissue. *J Electrocardiol*, 34 Suppl:65–68, 2001.
- B. Calvo, A. Ramírez, A. Alonso, J. Grasa, F. Soteras, R. Osta, and M. J. Muñoz. Passive nonlinear elastic behaviour of skeletal muscle: experimental results and model formulation. *Journal of Biomechanics*, 43(2):318–325, 2010.
- M. B. Cannell and D. G. Allen. Model of calcium movements during activation in the sarcomere of frog skeletal muscle. *Biophysical Journal*, 45(5):913–925, 1984.
- J. W. Fernandez, M. L. Buist, D. P. Nickerson, and P. J. Hunter. Modelling the passive and nerve activated response of the rectus femoris muscle to a flexion loading: a finite element framework. *Journal of Medical Engineering and Physics*, 27(10):862–70, 2005.

- R. Bottinelli and C. Reggiani. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 73(2-4):195–262, 2000.
- C. A. Maltin, M. I. Delday, A. G. Baillie, D. A. Grubb, and P. J. Garlick. Fiber-type composition of nine rat muscles. i. changes during the first year of life. *American Journal of Physiology*, 257(6 Pt 1):E823–E827, 1989.
- R. S. Staron, W. J. Kraemer, R. S. Hikida, A. C. Fry, J. D. Murray, and G. E. Campos. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult fisher 344 rats. *Histochemistry and Cell Biology*, 111(2):117–123, 1999.
- J. R. Torrella, J. M. Whitmore, M. Casas, V. Fouces, and G. Viscor. Capillarity, fibre types and fibre morphometry in different sampling sites across and along the tibialis anterior muscle of the rat. *Cells Tissues Organs*, 167(2-3):153–162, 2000.
- T. Soukup, G. Zacharová, and V. Smerdu. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred lewis rats. *Acta Histochemica*, 104(4):399–405, 2002.
- L. C. Rome. Design and function of superfast muscles: new insights into the physiology of skeletal muscle. *Annual Review of Physiology*, 68:193–221, 2006.
- J. Bruton, G. J. Pinniger, J. Lännergren, and H. Westerblad. The effects of the myosin-ii inhibitor n-benzyl-p-toluene sulphonamide on fatigue in mouse single intact toe muscle fibres. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 186(1):59–66, 2006.
- M. Böll, H. Stark, and N. Schilling. On a phenomenological model for fatigue effects in skeletal muscles. *Journal of Theoretical Biology*, 281(1):122–132, 2011.
- D. G. Allen, G. D. Lamb, and H. Westerblad. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiological Reviews*, 88(1):287–332, 2008.