



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“ADAPTACIÓN DEL FENOTIPO CELULAR DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO
DEL PERRO CON LESIONES TRAUMÁTICAS Y EN RESPUESTA AL
EJERCICIO COMO TERAPIA FÍSICA DE REHABILITACIÓN”.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

TANIA EDITH ARROYO MANZANILLA

TUTOR: LUIS OCAMPO CAMBEROS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTORAL:

JAIME ALONSO NAVARRO HERNANDEZ

ALICIA ORTEGA AGUILAR

MÉXICO, D. F.

JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

**“ADAPTACIÓN DEL FENOTIPO CELULAR DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO
DEL PERRO CON LESIONES TRAUMÁTICAS Y EN RESPUESTA AL
EJERCICIO COMO TERAPIA FÍSICA DE REHABILITACIÓN”.**

TESIS

QUÉ PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

TANIA EDITH ARROYO MANZANILLA

TUTOR

Luis Ocampo Camberos

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTORAL:

Jaime Alonso Navarro Hernández

Alicia Ortega Aguilar

MEXICO D.F

JUNIO 2013

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT agradezco la oportunidad que me brindó para llevar a cabo una escala profesional, más.

Al departamento de Posgrado de la FMVZ, Dra. Clara A., Dra. Marcela, Dr. Librado, Meche, Elsa, Maru, gracias, muestran siempre una actitud propositiva, cordial y cariñosa que he valorado todo este tiempo. Gracias.

Con especial reconocimiento al Laboratorio de Técnicas Histológicas de la Facultad de Medicina de UNAM por permitir la utilización de equipo, material, reactivos y sobre todo agradecer el apoyo y experiencia profesional, de la Técnica Verónica Rodríguez Mata.

Aprecio la intervención del Dr. Eduardo Carlos Santoscoy y del Dr. Joaquín Aguilar por permitir la utilización de recursos e instalaciones del Hospital Veterinario de Especialidades-UNAM.

Agradezco la generosidad y apoyo al Dr. Jaime Alonso Navarro, un excelente maestro.

Reconozco al MC. MVZ Moisés Valderrama por la transmisión de experiencia y conocimientos para conmigo y al Dr. Luis Ocampo Camberos por su paciencia y tolerancia, en esta no tan tersa, ni fácil tarea de culminar la Tesis.

Con cariño a todas esas personas que supieron y estuvieron interesadas en mi desempeño profesional de esta etapa y de quienes recibí muestras de afecto y

solidaridad. Colegas, familia, propietarios, amistades...Todas, quizá estuvieron en mi camino para darme un hilito de aliento, gracias, poderosa ayuda.

RESUMEN

Se realizó un análisis de fibras musculares del semitendinoso a 18 perros, de los cuales 10 eran clínicamente sanos (grupo Sano) y 8 con alteración traumática y cirugía ortopédica (grupo Qx), del grupo Sano (control) se tomó una biopsia muscular, al grupo Qx se realizó una primera biopsia el día de la cirugía correctiva y otra 8 semanas después de un programa de rehabilitación (grupo Rh) en el que se incrementó el ejercicio, hasta llegar a ser una rutina de trotar 4 km en 30 minutos; se utilizaron técnicas morfométricas, estructurales, contráctiles y metabólicas, encontrándose en todos los grupos mayor proporción de fibras tipo II, en comparación con las tipo I, con metabolismo oxidativo en todas y aumento en el número de núcleos en las fibras de los perros rehabilitados. En el grupo Qx disminuyó el tamaño fibrilar, los núcleos y los capilares, que en la segunda biopsia (grupo Rh) aumentaron, acercándose o superando a las proporciones del grupo Sano. Metabólicamente en todas las fibras de los grupos Qx y Rh se observó presencia de SDH (actividad oxidativa) y disminución del contenido de glucógeno lo que explica que ocurrió mayor consumo energético y lo que a su vez indica que el ejercicio moderado puede ser utilizado como terapia de rehabilitación en alteraciones traumáticas, y demuestra que ocurre adaptación muscular.

Palabras clave: Fibra muscular, mATPasa, perro, semitendinoso, ejercicio, rehabilitación.

ABSTRACT

Was applied an analysis of the semitendinosus muscle fibers to 18 dogs, of which 10 were clinically healthy (healthy group) and 8 dogs with alteration traumatic and orthopedic surgery (Group Qx), Sano (control) Group took a muscle biopsy, the Group Qx biopsy was performed a first corrective surgery day and another 8 weeks after a rehabilitation program (Group Rh) which increased the exercise to become a routine of jogging 4 miles in 30 minutes; morphometric techniques, structural, metabolic, and contractile were found in all groups higher fibre type II, in comparison with the type I, oxidative metabolism in all and increase in the number of cores in the fibers of the rehabilitated dogs. Group Qx fell in the fibrillar size, nuclei and the capillaries, which in the second biopsy (Rh group) increased, approaching or exceeding the proportions of the healthy group. Metabolically all fibers of the Qx and Rh groups was observed in presence of SDH (oxidative activity) and glycogen content decrease which explains that occurred higher energy consumption and at the same time indicating that moderate exercise can be used as a rehabilitation therapy in traumatic alterations, and shows that muscle adaptation occurs.

Key words: muscle fiber, mATPasa, dog, semitendinosus, exercise, rehabilitation.

INDICE

Contenido

Página

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INDICE	VI
1 INTRODUCCION	1
2 REVISION BIBLIOGRAFICA. LA FIBRA MUSCULAR Y SU CLASIFICACIÓN EN EL PERRO	3
2.1 CLASIFICACIÓN	5
2.2 CONSECUENCIAS DE LESIONES TRAUMATICAS	8
2.3 ADAPTACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO AL EJERCICIO	9
3 OBJETIVO	14
4 HIPOTESIS	15
5 MATERIAL Y METODOS	16
5.1 DEPENDENCIAS DONDE SE REALIZÓ EL PROYECTO	17
5.2 SUJETOS DE ESTUDIO	17
5.3 OBTENCIÓN DE BIOPSIAS MUSCULARES	20
5.4 PROTOCOLO DE REHABILITACION: EJERCICIO MODERADO	21
5.5 CONGELACIÓN DE BIOPSIAS MUSCULARES	22
5.6 CORTE DE LAS BIOPSIAS	23
5.7 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS	24
5.8 PROCESO DE FOTOGRAFIADO Y ANÁLISIS DE IMAGEN	29
5.9 ANALISIS ESTADISTICO	31
6 RESULTADOS	32

7 DISCUSION	47
8 CONCLUSIONES	54
9 FUENTES BIBLIOGRAFICAS	55
10 ANEXO: TECNICAS HISTOLOGICAS/ HISTOQUÍMICAS	61

I. INTRODUCCIÓN

Este trabajo pretende generar y transmitir avances en el conocimiento sobre la fisiología del músculo esquelético del perro sano y del que padece lesiones traumáticas, así como observar la adaptación muscular al ejercicio moderado durante la terapia física de rehabilitación, en estos últimos casos, y servir como una entidad diagnóstica, que permita emitir un pronóstico funcional en el proceso de rehabilitación post-quirúrgica de pacientes con alteraciones traumáticas. El conocimiento de estos parámetros, podrá ser un punto de partida para posteriores estudios sobre la adaptación del músculo esquelético del perro en diversas condiciones, como: reposo/actividad, enfermedades, crecimiento y desarrollo ó desempeño frente a múltiples protocolos de ejercicio terapéutico.

Existe el fenómeno de adaptación de las propiedades estructurales y funcionales de acuerdo con el tipo y la cantidad de esfuerzo físico impuesto al sistema, se ha demostrado que los músculos pueden sufrir tipos específicos de adaptaciones, que incluyen cambios tanto en la cantidad como en el tipo de proteínas que se expresan, este cambio en la expresión esta bajo el control de procesos moleculares y celulares que a su vez regulan el equilibrio de la síntesis de proteína y su degradación para isoformas proteínicas específicas (Strbenc 2006, Acevedo 2006). La expresión de genes alterados de isoformas proteínicas específicas, es un proceso central en la plasticidad de la adaptación muscular. Como tal la regulación genética de las isoformas buscadas, está a su vez bajo un complejo arreglo de células mensajeras señalizadoras, que en última instancia, integran el esfuerzo mecánico de los patrones específicos de utilización del músculo, en un proceso adaptativo, donde la estructura muscular y su función son transformadas (Strbenc 2005); para el proceso de retorno a la funcionalidad, la terapia física es, esté estímulo que altera el sistema y con el que se observa la recuperación progresiva.

Con esta observación podrían delimitarse el tipo de alteración de las fibras musculares, sí se tiene o no la capacidad de recuperación, el tiempo y ejercicio adecuado para la obtención de resultados y con ello disminuir el periodo de restablecimiento funcional, lo que también se verá reflejado en el costo-beneficio de la rehabilitación para el propietario del paciente.

La toma y análisis de la biopsia muscular antes y después de la rehabilitación es un método de diagnóstico precoz y de evaluación terapéutica, analizando desde una perspectiva celular y molecular la adaptación del músculo esquelético del perro durante la terapia física de rehabilitación. Los estudios sobre este tejido se han basado en la obtención de biopsias musculares de manera quirúrgica y con aguja percutánea (Lindholm y Piehl 1974; Acevedo y Rivero 2006), el cuál es un método inocuo, que permite el análisis de las características histológicas, histoquímicas (Brooke y Kaiser 1970, Rivero y cols, 1994) e Inmunohistoquímicas (Schiaffino y Reggiani 1996), caracterizando objetivamente al fenotipo muscular en cuanto a su diversidad y adaptación.

Los resultados de estas técnicas han permitido determinar el concepto de “tipos de fibras musculares” (Talmadge y cols. 1993), según el cual las fibras musculares se clasifican en grupos concretos, que difieren en sus propiedades morfológicas (tamaño, densidad nuclear y de capilares), contráctiles (velocidad máxima de contracción) y metabólicas (capacidad oxidativa, capacidad glucolítica, contenido de sustratos) de acuerdo al tipo de actividad que se esté realizando, edad y etapa fisiológica (Talmadge 1993, Baldwin 2002).

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

LA FIBRA MUSCULAR DEL PERRO

En los vertebrados el músculo esquelético representa del 40 al 50 % de peso corporal vivo, de este el 75 al 90% son miofibrillas, que constituyen la unidad celular básica del tejido muscular estriado esquelético, (Dubowitz 1985, Randall 1997). En el perro la masa muscular esquelética es entre 44 y 57% de peso corporal vivo, los músculos proporcionan la fuerza motriz para la locomoción, la respiración, vocalización y muchas más funciones que mantienen la vida (Taylor 1991).

Los miocitos o fibra musculares, se unen integrando haces o fascículos primarios, que a su vez asociados forman el músculo, cada uno de estos conjuntos se ve envuelto en tejido conjuntivo, así el endomisio es la delgada red de tejido conjuntivo con fibras de colágeno y reticulina, que envuelve a los miocitos, capilares sanguíneos y fibras nerviosas terminales. El perimisio con fibras densas de colágeno concede fijación a los haces adyacentes, está formando tejido conjuntivo interfascicular y también lleva la irrigación e inervación. El epimisio de considerable grosor y densidad y con una profusa cantidad de colágeno, es la capa mas externa de tejido conectivo en forma de vaina; el tamaño de los haces primarios está relacionado con la funcionalidad del músculo por lo que sí estos intervienen en movimientos sutiles y de alta especialidad presentaran fascículos de tamaño pequeño y con una gran proporción de perimisio.

Si los músculos están involucrados en movimientos de mayor recorrido y con una menor especialización como los utilizados en la locomoción, tienen menor cantidad de perimisio y sus fascículos son de gran tamaño.

La fibra muscular es una célula grande de 1-40 mm de longitud y diámetro que oscila entre 10-120 μm , está formada por fusión de numerosas células mononucleares, los mioblastos, componen así un sincitio continuo dentro del cual se distribuyen una gran cantidad de núcleos (Dellmann 1994).

La membrana que recubre a la célula muscular recibe el nombre de sarcolema, al citoplasma se denomina sarcoplasma y en él se disponen los elementos contráctiles del músculo, los miofilamentos agrupados en miofibrillas, además de mitocondrias, aparato de Golgi, retículo sarcoplásmico, mioglobina, glucógeno y vacuolas lipídicas. Las miofibrillas son las unidades contráctiles compuestas por los miofilamentos: las proteínas contráctiles de diámetro y estructura bioquímica diferentes, los miofilamentos gruesos ó bandas tipo A constituidos por miosina, con 200 Kd de peso molecular, es una molécula lineal con forma de bastón de golf, unos 1500 por filamento, con longitud de 200nm y 2-3 nm de diámetro, provista de una doble cabeza, que en situaciones óptimas se agrega en filamentos gruesos, esta doble cabeza presenta actividad enzimática adenosin trifosfatasa miofibrilar (m-ATPasa), atributo a considerarse para establecer la clasificación histoquímica de la fibra muscular. Los miofilamentos finos ó bandas tipo I, unos 3000 en los que predomina la actina, proteína globular de bajo peso molecular (42 Kd) también en esta se encuentran la tropomiosina y la troponina, que a pH fisiológico polimerizan formando una hélice de doble filamento. Para conformar la miofibrilla ambos miofilamentos se disponen paralelamente entre sí y al eje de contracción del miocito, de forma ordenada y alternante, ocupando gran parte del sarcoplasma y dando el aspecto estriado típico de la fibra muscular, bandas oscuras A y claras I (Guyton 2006, Dellmann 1994, Banks 1986).

Las células musculares esqueléticas son autosuficientes para llevar a cabo y mantener el ciclo de contracción y relajación. Es debido a que durante la excitación muscular de estas células, el calcio, que es el activador mecánico,

sale del retículo sarcoplásmico y se recaptura por él, por lo que queda listo para volver a ser usado.

El músculo es un motor eficiente cuya movilidad es causada por la activación de la miosina, los sitios de fijación entre la miosina y la actina se encuentran en la actina, que en condiciones de reposo están tapados por las proteínas reguladoras, la tropomiosina y en presencia de calcio la otra proteína reguladora, la troponina, que está adherida a la tropomiosina, mueve esta última para destapar los sitios de fijación entre la miosina y la actina. Esta unión conduce a la contracción, movimiento.

2.1 CLASIFICACIÓN

En los músculos esqueléticos de la mayoría de los mamíferos pueden ser determinados cuatro tipos fibrilares diferentes sobre la base de su actividad adenosin trifosfatasa miofibrilar (m-ATPasa) tras ser pre incubadas en medios ácidos y alcalinos: lentas o fibras tipo I y tres tipos fibrilares rápidos: IIA, IIB y IIC (Brooke y Kaiser 1970, Billeter y cols. 1981). Sin embargo, las diferencias entre especies en la labilidad del pH de la m-ATPasa existen, lo cual debe ser considerado durante la clasificación de los tipos fibrilares de las diferentes especies animales (Acevedo 2006).

La diversidad de la actividad m-ATPasa y las propiedades fisiológicas de las fibras esqueléticas musculares están relacionadas con la heterogeneidad de las proteínas miofibrilares, principalmente de las cadenas pesadas de miosina (MyHC). Cuatro isoformas frecuentes de MyHC pueden distinguirse en las fibras extrafusales de los músculos adultos del tronco y miembro de los pequeños mamíferos. La MyHC-I se expresa en las fibras tipo I o esquelética lenta, la MyHC-IIA y MyHCIIB son, respectivamente, expresadas en las fibras tipo IIA y IIB, y la MyHC-IIX o MyHCIID están presentes en un subgrupo de

fibras rápidas (tipo IID/IIX) (Schiaffino y cols., 1996; Pette y 1999). Existe una alta correlación entre el contenido en isoforma MyHC y las propiedades contráctiles de una fibra muscular. Estudios en fibras aisladas de roedores mostraron que la máxima velocidad de acortamiento de los tipos fibrilares se incrementaba en el siguiente orden: I < IIA < IIX < IIB (Strbenc 2006, Talmadge 2000).

Las fibras que co-expresan más de una isoforma MyHC simultáneamente son poco comunes y han sido marcadas como fibras híbridas (Pette 1999). En el pasado únicamente las fibras tipo IIC eran consideradas como híbridas, ya que co-expresaban las isoformas MyHC-I y MyHC-IIA, y se encuentran en los estados juveniles. No obstante, se pensaba que había un pequeño número de fibras híbridas (IIC) en los músculos esqueléticos adultos, sin embargo, su número podría aumentar durante las transformaciones de los tipos de fibra muscular. Recientemente se ha encontrado que diferentes MyHC rápidas ya desarrolladas son regularmente co-expresadas en los músculos adultos normales así como durante el desarrollo muscular, la regeneración, la denervación, las transformaciones inducidas eléctricamente y debido a cambios en el estado hormonal o entrenamiento físico (Schiaffino y Reggiani 1996, Strbenc 2006).

La mayoría de los estudios histoquímicos de los músculos del tronco y miembro de los perros se han basado en la actividad m-ATPasa de las fibras musculares; sin embargo, los resultados de estos estudios no han producido una clasificación clara de los tipos de fibras.

Mientras que las fibras tipo I y tipo II pueden ser fácilmente distinguidas después de la reacción de la m-ATPasa, la diferenciación de las subclases de las tipo II es bastante complicada (Latorre y cols. 1993). La mayoría de los autores describe las fibras tipo IIA y IIC mientras que otros subdividen las fibras tipo II dentro de los tipos IIA y IIB (Rivero y cols. 1994). Fibras similares a las

tipo IIB aunque más ácido lábiles que las IIB de otras especies, que también se demostraron en pocos estudios Gil (1986) y Latorre y cols. (1993) las denominaron fibras tipo II P, o fibras propias del Perro, se evidenciaron después de preincubaciones alcalinas (pH 10.4) y acidas (pH 4.6). Las fibras tipo II Perro difieren de las clásicas fibras tipo IIB en la intensidad de su tinción después de preincubación alcalina; no obstante, después de preincubación en medio ácido, la intensidad de la tinción variaba con los diferentes procedimientos histoquímicos.

Los primeros intentos de clasificación de los tipos de fibras determinados, según su m-ATPasa y sus propiedades metabólicas al mismo tiempo, mostraban que eran defectuosos (Pette 1999, Strbenc 2004). De forma similar, los datos publicados sobre las propiedades metabólicas de las fibras musculares del perro son controvertidos, especialmente en el caso de los tipos fibrilares rápidos. En la mayoría de los estudios se demostró que todas las fibras tipo II eran de moderada a altamente oxidativas (Rivero y cols. 1994; Latorre y cols. 1993), pero también se publicó que las fibras rápidas eran solo ligeramente oxidativas. A pesar de los muchos estudios histoquímicos, apenas hay datos claros disponibles sobre el patrón de la expresión de las isoformas MyHC en las fibras de los músculos del tronco y miembros del perro.

Una característica metabólica del músculo del perro es que los tipos fibrilares de contracción rápida son moderadamente ó altamente oxidativos. La ausencia de fibras glucolíticas puras es quizá responsable de la alta capacidad de resistencia de esta especie. La densidad nuclear es mayor en las fibras tipo I que en las II, Dentro de los subtipos de las fibras II, el número relativo total de núcleos disminuye en el orden IIA>IIX>IIB y está relacionado con la densidad capilar y la capacidad oxidativa de las fibras tipo II en el músculo del perro. (Acevedo 2006).

2.2 CONSECUENCIAS DE LESIONES TRAUMATICAS

Las alteraciones traumáticas de los perros en las metrópolis hoy en día son una causa frecuente de consulta veterinaria, en la práctica clínica se requiere un diagnóstico preciso para la mejor evolución de la lesión, la atención es por consulta externa o urgencias y la resolución puede ser: desde indicaciones de manejo en casa (inmovilización, fisioterapia, cambio de ambiente) y medicación o hasta correcciones quirúrgicas y posterior rehabilitación.

Las lesiones traumáticas pueden involucrar daño estructural al sistema muscular, articular y óseo, ya sea por contusión, laceración, elongación, ruptura, síndrome compartimental, isquemia y denervación; en el tejido osteotendinoso: rupturas, esguinces, luxaciones y/o fracturas.

Las patologías más frecuentes son la ruptura de ligamento craneal cruzado (RLCC), fracturas femorales y de cadera, luxación tarsal, patelar y coxofemoral.

Algunos de los cambios estructurales y fisiológicos de mayor relevancia, del sistema Musculoesquelético en el que están implicadas las lesiones traumáticas, ocurren por el desuso e inmovilización, muchas veces como consecuencia de la reparación quirúrgica que se realiza. La disminución de la actividad tiene como consecuencia atrofia osteomuscular y cambios articulares, sí el desuso continua los elementos visco elásticos del tejido muscular se ven reemplazados por tejido fibroso que redundará en menor capacidad de movimiento (Leighton 1991).

Los músculos extensores con mayor proporción de fibras I (fibras lentas) y que cruzan una sola articulación son más susceptibles a la atrofia, como resultado de la disminución de la carga mecánica, en comparación con aquellos que tienen más fibras tipo II y que no son usados como músculos posturales, la pérdida de la fuerza muscular, se debe a la pérdida de la masa muscular. Las

fibras tipo IIC representan un estado transicional entre los tipos I y II y son precursores de los tipos IIA y IIB en los neonatos (Millis 2005, Gil 1986).

La atrofia después de la cirugía es común, se pierde 1/3 de masa muscular en el miembro afectado después de la corrección por RLCC, la pérdida se detecta después de las primeras dos semanas y continúa por lo menos 5 semanas más, si no hay intervención de rehabilitación (Millis 2007).

Por la inmovilización y/o desuso disminuye la carga continua de peso, con lo cual se observa una reducción en el diámetro de las fibras musculares, también hay decremento de la fuerza muscular que ocurre rápidamente en la primera semana de desuso y la función mitocondrial y síntesis de proteína se ven demeritadas. La atrofia se observa en diferente nivel, en las fibras que han tenido mayor función y la posición en que han sido afectadas, por ejemplo en los músculos que tienen un función de movimiento al ser inhibida la carga y el movimiento se ven afectadas las fibras tipo IIA y en menor grado las tipo I y las tipo IIX. Aunque la masa muscular se recupera lentamente, la atrofia puede permanecer hasta un año. La rehabilitación puede atenuar considerablemente la pérdida de masa muscular (Steiss 2002, Millis 2007).

2.3 ADAPTACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO AL EJERCICIO

Las fibras musculares son reconocidas como plásticas, sus características fenotípicas y funcionales están sujetas a cambios en respuesta a patrones de actividad. Existen cuatro fenotipos de isoformas de cadena pesada de miosina (MyHC) que son I lentas, IIA rápidas, IIB rápidas y IIC transicionales, caracterizadas por su capacidad de expresar isoformas (especies moleculares de una proteína dada), son moléculas con ligeras variaciones de composición de aminoácidos con capacidades diferentes en cuanto a contractilidad y reactividad (Baldwin 2002).

El proceso de adaptación del músculo es la capacidad de variar su contractilidad y reactividad que se puede influenciar por el ejercicio terapéutico porque favorece la recuperación progresiva de la actividad, al actuar como estímulo; la ausencia de degeneración nuclear puede explicar porque el músculo tiene una sorprendente facultad de recuperación, después de una prolongada inactividad, cuando se restablece la actividad (Gundersen 2008).

De acuerdo a los resultados morfométricos y metabólicos se realiza la comparación de la caracterización fibrilar obtenida: en el músculo del perro se encuentran fibras I, IIA, IIB y IIC, y la proporción y tamaño de ellas varía de acuerdo a la función de cada músculo, así como a la edad y actividad de cada individuo (Millis 2007).

La adaptación de las propiedades estructurales y funcionales de acuerdo con el tipo y la cantidad de esfuerzo físico impuesto al sistema, ha demostrado que los músculos pueden sufrir tipos específicos de adaptaciones, que incluyen cambios tanto en la cantidad como en el tipo de proteínas que expresa, este cambio en la expresión esta bajo el control de procesos moleculares y celulares que a su vez regulan el equilibrio de la síntesis de proteína y su degradación para isoformas específicas proteicas. La expresión de genes alterados de isoformas proteicas específicas, es un proceso central en la plasticidad en la adaptación muscular. Como tal la regulación genética de las isoformas buscadas, está a su vez bajo un complejo arreglo de células mensajeras señalizadoras que en última instancia integran el esfuerzo mecánico de los patrones específicos de utilización del músculo en un proceso adaptativo, donde la estructura muscular y su función son transformadas. (Hoppeler 1986).

La plasticidad muscular es la habilidad de una célula muscular dada de alterar ya sea la cantidad de proteína o el tipo, (isoforma o fenotipo) abarcando sus diferentes componentes celulares en respuesta a cualquier estímulo que interrumpa su homeostasis normal.

El potencial de plasticidad del músculo puede manifestarse de tres maneras 1) un cambio en la cantidad de proteína, 2) el tipo de isoforma proteica que expresa y 3) una combinación de ambas.

Entrenamiento-ejercicio moderado

Una actividad física realizada regularmente del tipo de resistencia, la cual eleva los requerimientos de energía del organismo hasta aproximadamente 70-80% de su capacidad aeróbica máxima, induce a una sobre regulación de los sistemas enzimáticos mitocondriales del ciclo de Krebs de la cadena de transporte de electrones y de la biosíntesis hemática, hay un incremento en la expresión de estas enzimas involucradas en la activación de ácidos grasos, en la traslocación y oxidación y en aquellas proteínas transportadoras, que están relacionadas con el consumo de glucosa en las células musculares (McGowan 2007).

Se ha reportado que puede haber un ligero aumento de aquellas fibras que abarcan unidades motoras de contracción lenta, fuertemente utilizadas durante cada sesión de entrenamiento. Por lo tanto hay una expansión selectiva de la reserva mitocondrial que producen aquellas fibras fuertemente involucradas en el apoyo de la actividad de resistencia con algunos decrementos pequeños que ocurren en los sistemas enzimáticos que soportan los procesos de transformación de energía anaeróbicos. Puede haber ligeras transformaciones en la expresión de isoformas MyHC de tal manera que las formas intermedias rápidas (IIA, IIX) con una cinética cíclica de puente cruzado económico (baja actividad específica de adenosin trifosfato) son expresadas en lugar de MyHC rápidas. Consecuentemente cuando el ejercicio de una intensidad y duración moderada dada se realiza en el entrenamiento el ejercicio general o que involucre a todo el cuerpo, resulta más económico para el individuo que lo

realiza. Además existe un gran apoyo en la grasa como fuente principal de un sustrato de energía el cual es puesto en marcha por una reducción de una contribución relativa de carbohidratos endógenos a las necesidades totales de energía del individuo. Esta transformación en la utilización del sustrato se debe en gran medida en un aumento en el nivel de expresión de aquellos sistemas enzimáticos, involucrados en el procesamiento de ácidos grasos para la producción de energía (trifosfato de adenosina) en la vía de oxidación beta en la mitocondria y en el almacenamiento de equivalentes reductores derivados tanto del citosol como de compartimentos mitocondriales para la reducción del oxígeno molecular a agua, en la cadena de transporte de electrones. Una síntesis aumentada de proteínas de señal como citrato-sintasa puede ser inducida independientemente de un aumento en la reserva correspondiente de mRNA, ilustrando la importancia del papel que la actividad de síntesis de la proteína puede jugar en aumentar la expresión mitocondrial en respuesta a una actividad contráctil aumentada (Millis 2007).

Descarga

En el otro extremo el patrón opuesto de transformación ocurre cuando el músculo no tiene carga, como ocurre con la exposición a un ambiente de microgravedad, bajo estas condiciones las fibras musculares se atrofian, tanto en los músculos anti gravitacionales como en los locomotores. Las fibras del tipo de contracción lenta, sufren transformaciones en las cuales una porción de la miosina lenta es degradada y reemplazada por isoformas más rápidas: MyHC (principalmente IIX). Bajo estas condiciones una nueva especie de fibras llamada híbrida lenta-rápida es creada. Lo que se conoce como aceleración del aparato contráctil, en estas fibras seleccionadas, hay cambios en la expresión de proteínas involucradas en liberación y secuestro del calcio en donde grandes cantidades de estas proteínas cíclicas del calcio, se expresan en las fibras musculares atrofiadas.

Bajo condiciones de descarga la capacidad oxidativa por unidad de masa de tejido no está marcadamente alterada, aunque hay una reducción en la capacidad para procesar los ácidos grasos como una forma de sustrato de energía, esto último no puede ser atribuido a una reducción en las enzimas que involucren procesos oxidativos beta.(Lieber 1987).

3. OBJETIVO

Demostrar que al aplicar un protocolo de rehabilitación, basado en ejercicio moderado se obtienen cambios, en la fibra muscular del perro que propician la recuperación de la función.

4. HIPÓTESIS

El ejercicio físico actúa como un estímulo que promueve la adaptación muscular, en consecuencia los sujetos con lesiones traumáticas y que tuvieron disminución en la función normal (inactividad, inmovilidad, falta de apoyo) se verán beneficiados, se revertirá la atrofia y la fibra cambiará su conformación y metabolismo.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Para identificar a las fibras musculares se consideran las propiedades de cada uno de los tipos, los cuales difieren según sus características moleculares, estructurales, contráctiles y metabólicas, el proceso de tipificación basado en la desnaturalización ácida y alcalina de la m-ATPasa se ha extendido a varias especies y es una valoración cualitativa de la miosina, que determina el tipo y la velocidad de contracción, también se consideran enzimas asociadas con el metabolismo glucolítico y oxidativo, y para las propiedades morfológicas la medición del área transversal, número de capilares y núcleos; para el presente trabajo se consideraron dos grupos, el grupo 1 que sirve de control con sujetos sanos, para tener una base de comparación y el grupo 2 de experimentación, que cursó con lesiones traumáticas y posterior programa de rehabilitación.

Figura 1

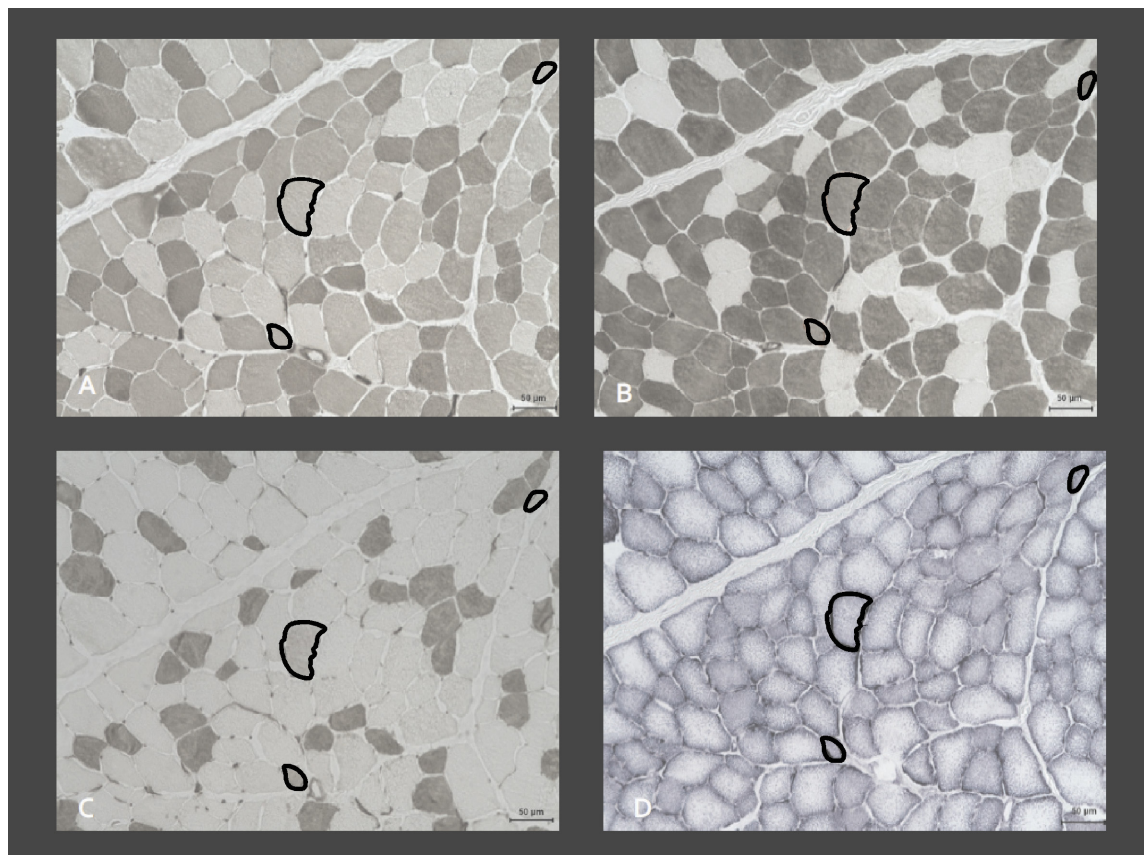


Figura 1. Músculo semitendinoso, Técnica de mATPasa: **A**- pH 4.6, **B**-pH 10.6, **C**-pH 4.3, **D**-Técnica NADH-Tr, las fibras con el borde señalado son tipo IIC.

5.1 DEPENDENCIAS DONDE SE REALIZÓ EL PROYECTO

- Laboratorio de Técnicas Histológicas de la Facultad de Medicina UNAM
- Área de enseñanza de Cirugía, Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para perros y gatos, FMVZ UNAM
- Quirófanos y área de rehabilitación del Hospital Veterinario de Especialidades UNAM (HVE)
- Laboratorio del Departamento de Fisiología y Farmacología FMVZ UNAM

5.2 SUJETOS DE ESTUDIO

Este protocolo fue evaluado y aceptado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y uso de Animales en Experimentación (SICUAE) de la FMVZ-UNAM.

El presente experimento se realizó utilizando una muestra disponible de 18 perros domésticos (7 machos y 11 hembras) tenían de 2 a 5 años de edad, 15 a 30 kg de peso, de razas medianas y mestizos. Los sujetos sanos (grupo Sanos) fueron seleccionados aleatoriamente del servicio de enseñanza quirúrgica y los que tenían traumatismo (grupo QX) fueron seleccionados aleatoriamente del servicio de consulta del HVE durante el periodo de noviembre-septiembre de 2010, e ingresaron al estudio por consentimiento informado de sus propietarios. Cuadros 1 y 2

El grupo de sujetos sanos (grupo Sanos o de control), estuvo formado por 10 sujetos con características que se describen en el cuadro 1, cuya función zootécnica fue la de ser utilizados como modelos de enseñanza quirúrgica, este grupo sirvió como control, para ello se considero como criterio de inclusión

además de talla y peso, el realizar un examen físico general para establecer edad aproximada y que las constantes fisiológicas demostraran que se encontraban libres de signos relacionados con alguna enfermedad, es decir que estuvieran clínicamente sanos. Y el grupo de experimental (grupo Qx y Rh) por los 8 sujetos restantes cuyas características se describen en el cuadro 2; se considero que la variable sexo no era relevante para el estudio.

SUJETO	RAZA	SEXO	PESO Kg
1	Mestizo	Hembra	23.3
2	Mestizo	Hembra	15
3	Mestizo	Hembra	16.3
4	Mestizo	Hembra	18.3
5	Mestizo	Hembra	18.5
6	Mestizo	Hembra	18.5
7	Mestizo	Hembra	15.5
8	Mestizo	Macho	25
9	Mestizo	Hembra	19
10	Mestizo	Macho	27

Cuadro 1. Características generales de los sujetos del grupo 1

Los criterios de inclusión del grupo 2 (Qx y Rh) fueron:

- Expediente médico HVE-UNAM
- Semiología de alteración ortopédica y de la marcha
- Pruebas diagnósticas
- Diagnóstico clínico y tratamiento quirúrgico
- Aceptación del propietario por escrito

Con estas consideraciones 8 sujetos, perros de compañía, completaron el grupo. La toma de la primera biopsia del grupo Qx se realizó posterior al manejo quirúrgico correctivo de cada caso y la segunda después del periodo de rehabilitación establecido (grupo Rh). Cuadro 2

SUJETO	RAZA	SEXO	PESO CORPORAL (kg)	CORRECCIÓN QUIRÚRGICA
1	Cobrado-Labrador	Hembra	29	TTA/RLCC
2	Doberman Pinscher	Macho	27	Osteosíntesis Femoral
3	Mestizo	Macho	18	Excisión AF
4	Mestizo	Macho	19	Osteosíntesis Femoral
5	Setter Irlandés	Macho	22	Osteosíntesis Femoral
6	Cobrador Dorado	Hembra	30	TTA/RLCC
7	Mestizo	Hembra	17	TTA/ RLCC
8	Mestizo	Macho	28	Excisión AF

Cuadro 2. Características del grupo 2 de sujetos con lesiones traumáticas, **TTA/RLCC**, adelantamiento de tuberosidad tibial para corrección de ruptura de ligamento craneal cruzado, **Excisión AF**, Excisión Artroplástica de cabeza femoral.

5.3 OBTENCIÓN DE BIOPSIAS MUSCULARES:

Lo obtención de las biopsias para los dos grupos fue similar salvo que para el grupo Sanos se realizó con anestesia fija. Esta se llevó a cabo utilizando técnicas de asepsia quirúrgica al miembro pélvico, para toma excisional con bisturí, se realizó incisión en piel, previa identificación de las referencias anatómicas del músculo semitendinoso, que se encuentra en el origen entre el bíceps femoral y el semimembranoso y descansa en su inserción sobre la porción medial del gastrocnemio cubierto por el gracilis, también se inserta en la tuberosidad calcánea (Evans 2002).

Se practicó la disección, retiro de tejido graso y conectivo, se efectuaron cortes paralelos del sitio elegido, para obtener una porción de 6 mm largo por 3 mm ancho, por 3 mm de espesor aproximadamente; las muestras musculares se acomodaron de acuerdo a la longitud, previa protección con OCT Compoud Tissue Tek. Figuras 2 y 3.

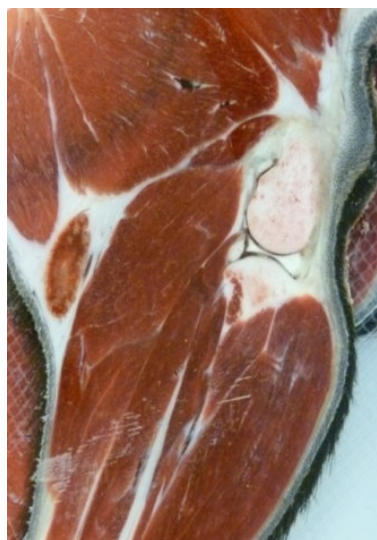


Figura 2 Vista medial, la flecha señala el músculo semitendinoso



Figura 3 Delimitación del corte de la biopsia

La toma de la biopsia muscular se realizó durante los procedimientos de práctica de licenciatura del área de enseñanza en Cirugía, previa tranquilización con meleato de acepromacina a dosis de 0.2 mg/kg IM y la administración de anestesia fija con pentobarbital sódico a dosis de 30 mg/kg IV. Figura 4.

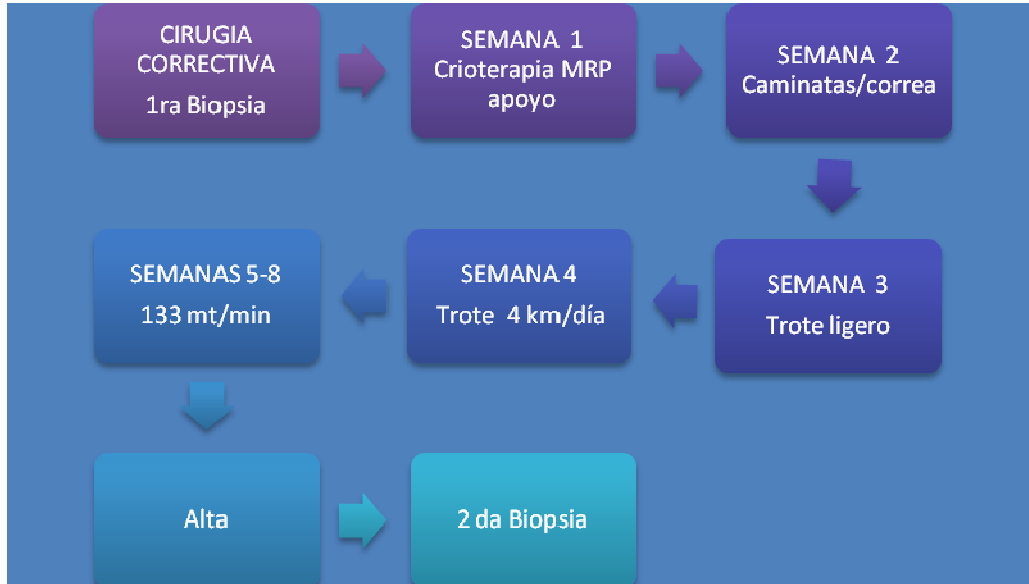


Figura 4. Toma de biopsia, músculo semitendinoso, incisión de 2 cm

5.4 PROTOCOLO DE REHABILITACIÓN: EJERCICIO MODERADO

Se implementó el protocolo iniciando el mismo día de la corrección quirúrgica con crioterapia cada dos horas con el propósito de controlar el dolor y la inflamación (McGowan 2007), también se realizaron series de movilizaciones pasivas 2 veces al día y se promovió la cuadripedestación con apoyo cuando el caso lo requería durante la primera semana. A partir de la segunda semana los perros empezaron con una caminata con apoyo y correa al día, durante 5 minutos y progresaron paulatinamente hasta dos caminatas de 10 minutos al día, en la tercera semana se aumento la velocidad para lograr un trote ligero en dos ocasiones por día durante 15 minutos, a partir de la cuarta semana la distancia se aumento hasta 4 km por día divididos en dos salidas a trotar, con

un tiempo de 15 minutos cada una, de la quinta a la octava semana el ejercicio consistió en trotar por 30 minutos a una velocidad constante que permitiera recorrer los 4 km en ese tiempo. Cuadro 3



Cuadro 3 Adaptado de "ejercicio moderado". Millis cols; Canine rehabilitation and Physical therapy, chapter 7, 2004, Missouri, WB Saunders

5.5 CONGELACIÓN DE LAS BIOPSIAS

Tras la obtención de las muestras se realizó la congelación ultrarrápida que se llevó a cabo de acuerdo al método de isopentano (2-metilbutano) enfriado en nitrógeno líquido, descrito por Dubowitz/Brooke (1973).

En un vaso de precipitado con aproximadamente 100 ml de isopentano (2-metilbutano), previamente enfriado en un termo con nitrógeno líquido a -190°C hasta observar paredes y fondo del vaso escarchados (temperatura óptima -160°C) se introdujeron las muestras por espacio de 20-40 segundos, con esta técnica se trata de producir una congelación rápida y atraumática, apta para conservar íntegras las características enzimáticas e histológicas de las estructuras musculares; se depositaron en viales cilíndricos, identificándolas con etiquetas y se colocaron en un contenedor dentro del congelador a -80°C , donde permanecieron hasta que se realizó el corte.

5.6 CORTE DE LAS BIOPSIAS

Se realizó el corte seriado de las biopsias congeladas, a -25°C en criostato 2800 Frigocut (Reichert-Jung, Leica, Bensheim, Alemania), con los siguientes grosores 10, 12 y 14 μm , que fueron depositados sobre portaobjetos cubiertos con anterioridad con Poli-L-lisina al 5%. La adherencia al portaobjetos fue por contacto con la cuchilla del criostato.

Para corroborar que no hubiera artefactos durante la congelación e identificar la posición del músculo, que permita cortes trasversales, se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina, sí coincidía el corte transversal de las fibras musculares, se procedía al corte de la muestra, obteniéndose 36 cortes seriados por muestra disponiéndose tres en cada portaobjeto. Los portaobjetos fueron dispuestos en cajas enfriadas y posteriormente almacenados a -80°C , hasta su utilización para las diferentes técnicas.

5.7 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS

(Descritas en el ANEXO)

Tinción Hematoxilina-Eosina (HyE)

Se utilizó en los primeros cortes de cada muestra para verificar la disposición transversal de las fibras musculares, confirmar ausencia de artefactos por congelación y analizar la morfología de los miocitos. Se observan los núcleos teñidos de azul, las fibras color rosa y el tejido conectivo de color rosa claro. (Sida y cols, 1995). Figura 5

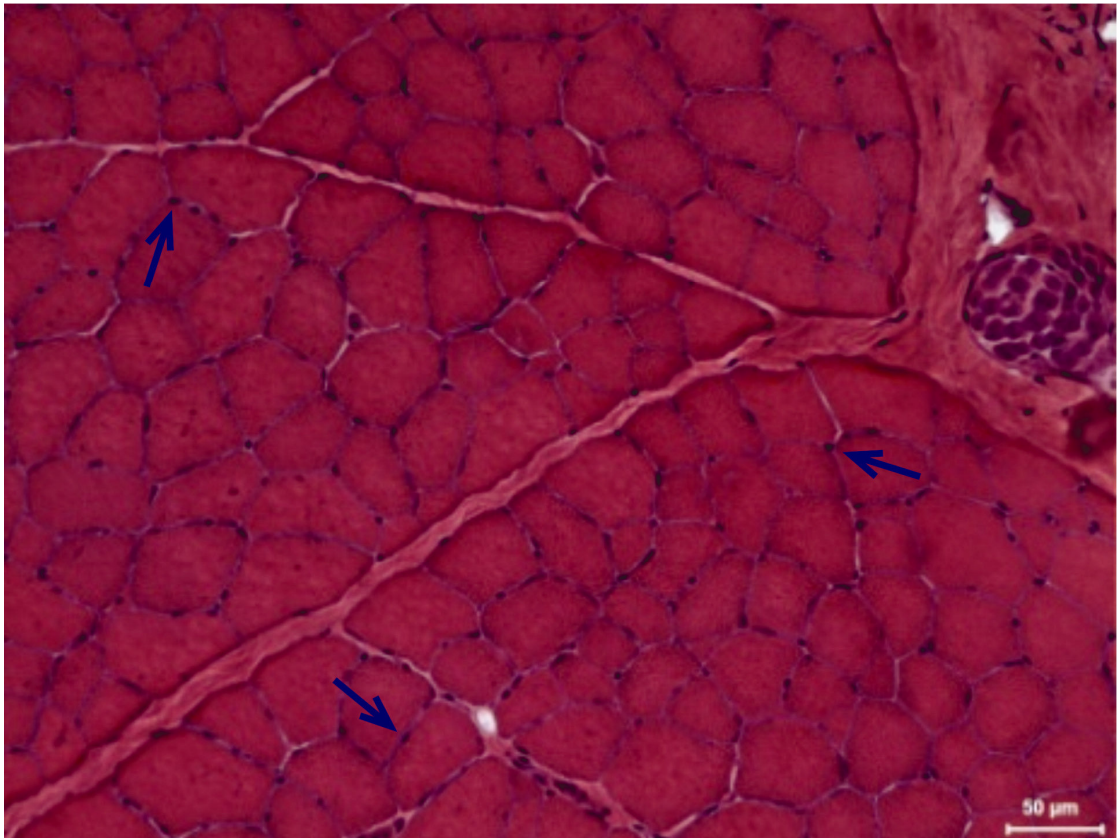


Figura 5 Tinción H y E. En esta tinción de hizo la medición del área transversal, las flecha señalan a núcleos

Tinción Ácido Peryódico de Schiff (PAS)

La tinción del glucógeno en las fibras se demuestra con esta técnica, también sirvió para la identificación de los capilares, que se encuentran en la periferia y cuya membrana basal es sujeta de adherencia al color.

Para determinar si una fibra PAS positiva (Per-yódica de Schiff), está compuesta de glucógeno, se trató con un preparado control con la enzima α -amilasa, (α -Amilasa PAS) que escinde el glucógeno específicamente. Figura 6

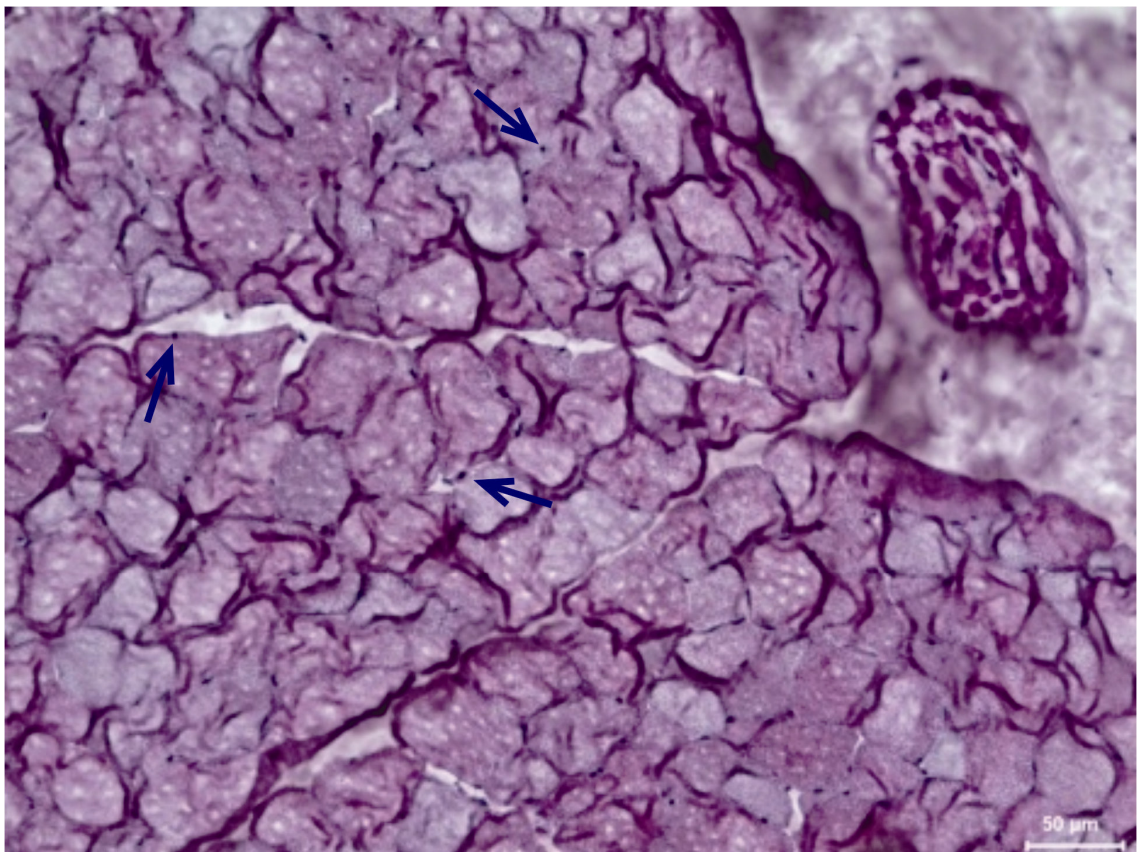


Figura 6 Tinción PAS. Mayor intensidad en fibras con glucógeno y visualización de capilares, flechas.

TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

La técnica de detección de ATPasa miosínica (m-ATPasa) con preincubaciones alcalinas y ácidas, para valorar las características contráctiles de los miocitos y la succinato deshidrogenasa (SDH), a fin de determinar el potencial oxidativo o glucolítico por medio de la alfa glicerol fosfato deshidrogenasa (α GPDH) o sea las características metabólicas de las fibras musculares.

m-ATPasa

De acuerdo a este tipo de técnicas son detectadas, mediante microscopía óptica, la actividad ATPasa (ausencia ó presencia) de la miosina contenida en el miocito. Las preparaciones son incubadas en una solución con ATP y Calcio a pH 4.5. La enzima ATPasa, en este pH, libera el fosfato terminal que se combina con el calcio formando fosfato cálcico, insoluble a pH alcalino, que precipita en los lugares donde se produce la reacción enzimática. Después se añade cloruro de cobalto, el cobalto sustituye al calcio, transformándose en fosfato de cobalto que precipita en los mismos sitios que el fosfato cálcico, finalmente se transforma en sulfuro de cobalto al ser sometido a la presencia de solución de sulfuro de amonio, también es insoluble y de coloración negra, por lo que se puede demostrar por microscopía óptica la actividad de la m-ATPasa, en las fibras musculares (Dubowitz y Brooke, 1973).

Al exponerse previamente las biopsias musculares a medios de diferente pH (ácidos 4.3-4.6 y alcalinos 10.2-10.6) se logra evidenciar un mayor número de tipos fibrilares, debido a la diferente labilidad de las distintas isoformas de miosina de las fibras musculares. Por lo tanto se puede observar la coloración de las miofibrillas separadas por el espacio intermiofibrilar, que no llega a teñirse. Figuras 7 y 8.

mATPasa pH 4.6

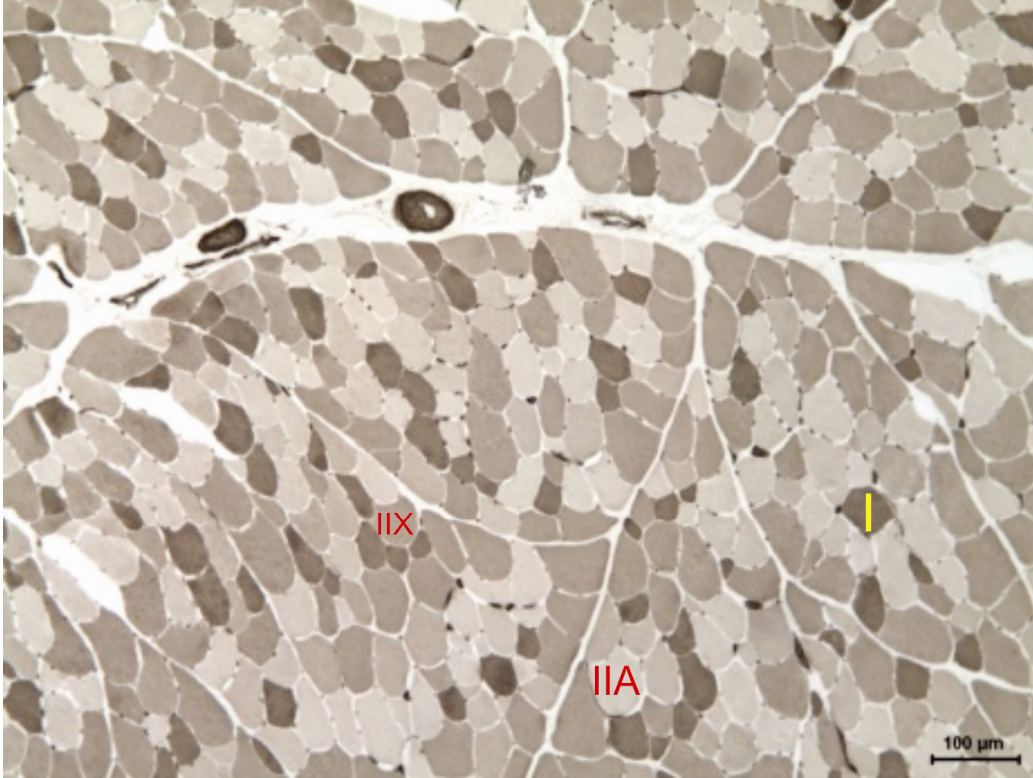


Figura 7 Las fibras oscuras son I, las intermedias IIX y las claras IIA

mATPasa pH10.4

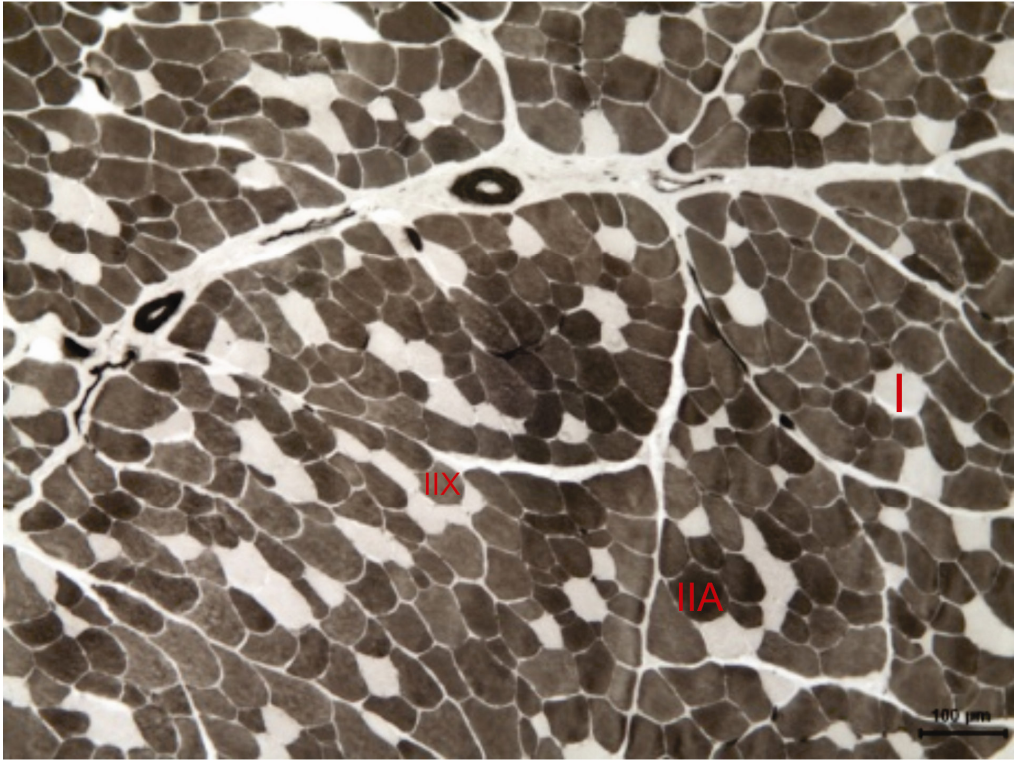


Figura 8 Las fibras oscuras son IIA, las intermedias IIX y las claras I

Tinción Succinato Deshidrogenasa (SDH)

Las enzimas oxidativas, tales como las deshidrogenasas, diaforasas (NADH-Tr) y oxidasas tiene relevancia debido a que reflejan la utilización de diferentes intermediarios metabólicos del ciclo de Krebs y vías relacionadas en la mitocondria y son utilizadas como marcadores de la capacidad oxidativa, por lo tanto indican las posibles fuentes de energía en el metabolismo muscular, (Blanco 1985).

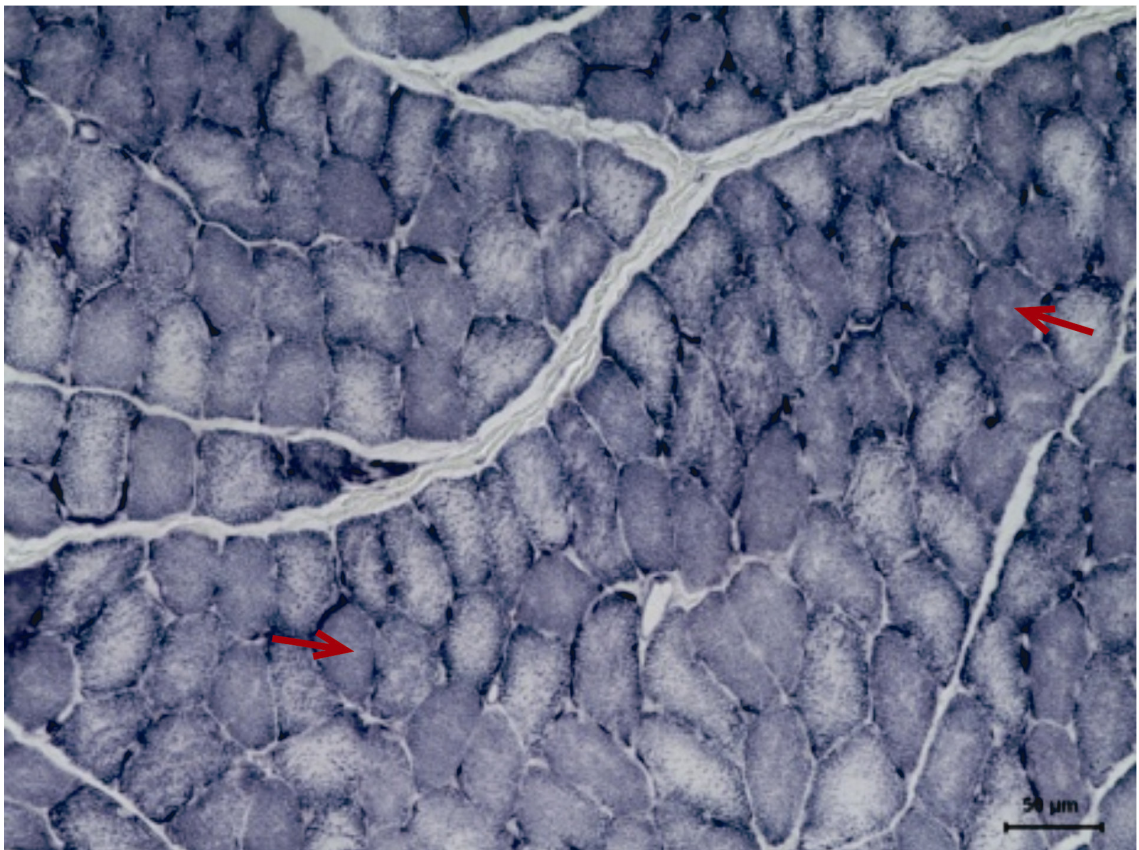


Figura 9 SDH Las fibras con mayor intensidad tienen metabolismo oxidativo

Tinción Alfa glicerol fosfato deshidrogenasa (α GPDH)

Es una enzima que se emplea en la determinación de la capacidad glucolítica de las fibras musculares, esta técnica tiene al alfa glicerol fosfato como sustrato e indica las posibles fuentes de metabolismo glucolítico. (Martín 1985).

5.8 PROCESO DE FOTOGRAFIADO Y ANÁLISIS DE IMAGEN

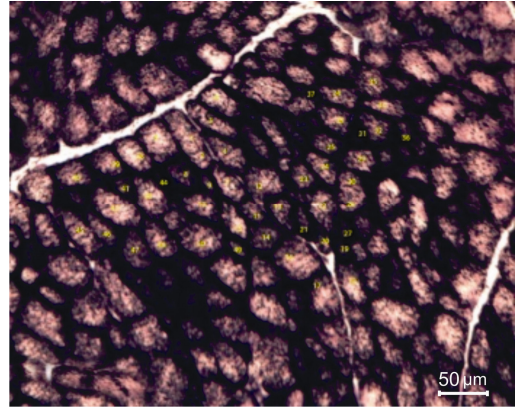
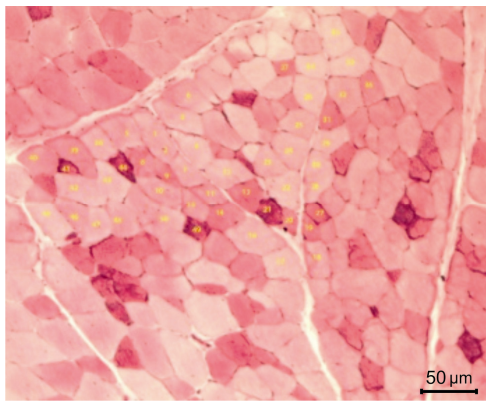
Después de llevarse a cabo las técnicas histológicas e histoquímicas, se procedió al fotografiado de los cortes de las biopsias, la captura de la imagen, a 10x se hizo con un microscopio óptico (Motic® Type BA200) y una cámara de alta resolución con tarjeta gráfica. Para las áreas se analizaron 50 fibras musculares por sección escogida, sin artefactos, las células se numeraron de forma aleatoria y fueron las mismas en cada tinción.

Se estableció el área morfométrica transversal de las miofibras, obteniendo +/- 1000 μm^2 , con lo cual se determinaron las diferencias morfométricas para cada fibra con las tinciones HE y α -amilasa PAS estas fueron: área transversal, densidad capilar y densidad nuclear.

En la determinación de la actividad enzimática en las tinciones histoquímicas, se utilizó el programa de análisis morfométrico Image J Proplus (V.1.4.1. para Windows vista/XP/Macintosh) por medio de densidad óptica, la calibración utilizada fue el valor del fondo blanco para cada una de las tinciones y se consideró como mínimo en cada muestra analizada.

El análisis de imágenes logra cuantificaciones objetivas y repetibles (Weibel 1989, Userpater 2003). La utilización de este análisis computarizado de imágenes es óptimo para la cuantificación de reacciones estequiométricas.

Los parámetros de las reacciones colorimétricas permiten identificar estructuras, establecer número o área de tinción y densidad óptica. (Wells 1993). Figuras 10-12



Figuras 10 PAS y 11 SDH Fibras numeradas de tinciones de una misma biopsia.

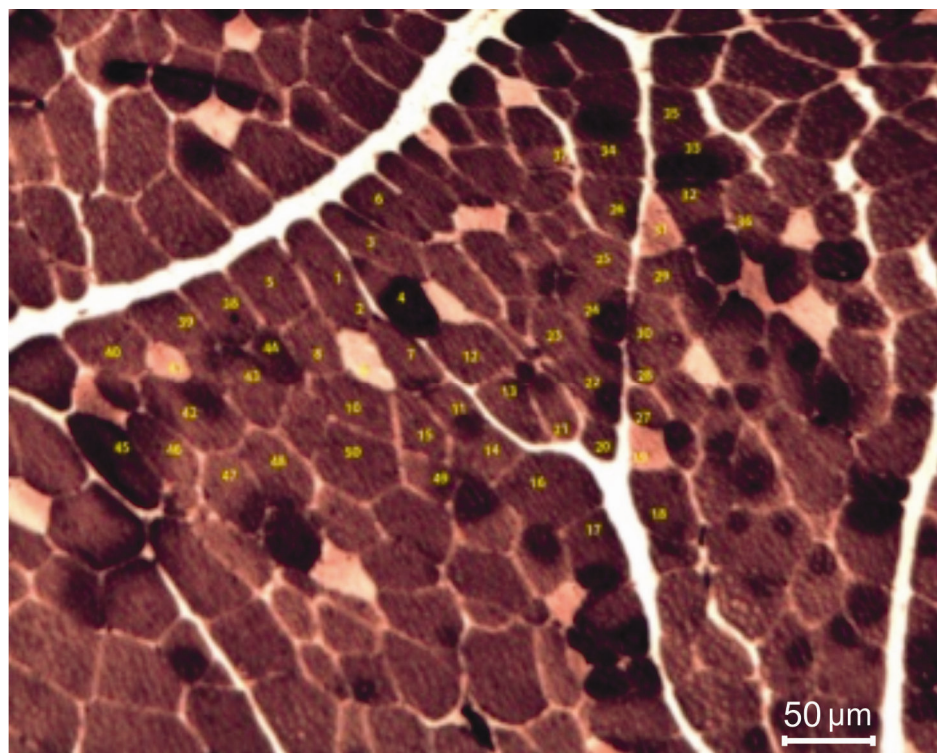


Figura 12 m-ATPase 10.4, Fibras musculares numeradas, de biopsia de las fig. 10 y 11, obsérvese el fondo blanco, que sirve de calibración para la densidad óptica.

5.9 ANALISIS ESTADISTICO

Con los datos obtenidos del análisis de las imágenes se obtuvo una base de datos que consistieron en 50 fibras musculares por biopsia, de cada uno de los perros de los tres diferentes grupos; clínicamente sanos, 1ra biopsia de perros con lesión ortopédica, durante la corrección quirúrgica y 2da biopsia después de la rehabilitación, las cincuenta fibras analizadas tuvieron que ser las mismas en cada una de las tinciones. Se realizó estadística descriptiva, promedios y errores estándar del promedio; así como el análisis de datos categóricos para contrastar la diferencia entre los rangos medios entre los grupos de estudio para cada variable de interés, por medio del análisis de varianza no paramétrico de suma de rangos de Wilcoxon/Kruskal-Wallis, debido a que ninguna de las variables mencionadas se distribuyeron conforme al modelo normal, y en aquellos casos en los que esta prueba resultara significativa ($P < 0.05$) se contrastaron las diferencias entre cada dos de los grupos, por medio de la prueba de rango crítico de Dunn a nivel de significación estadística $\alpha = 0.05$.

6. RESULTADOS Y GRAFICAS

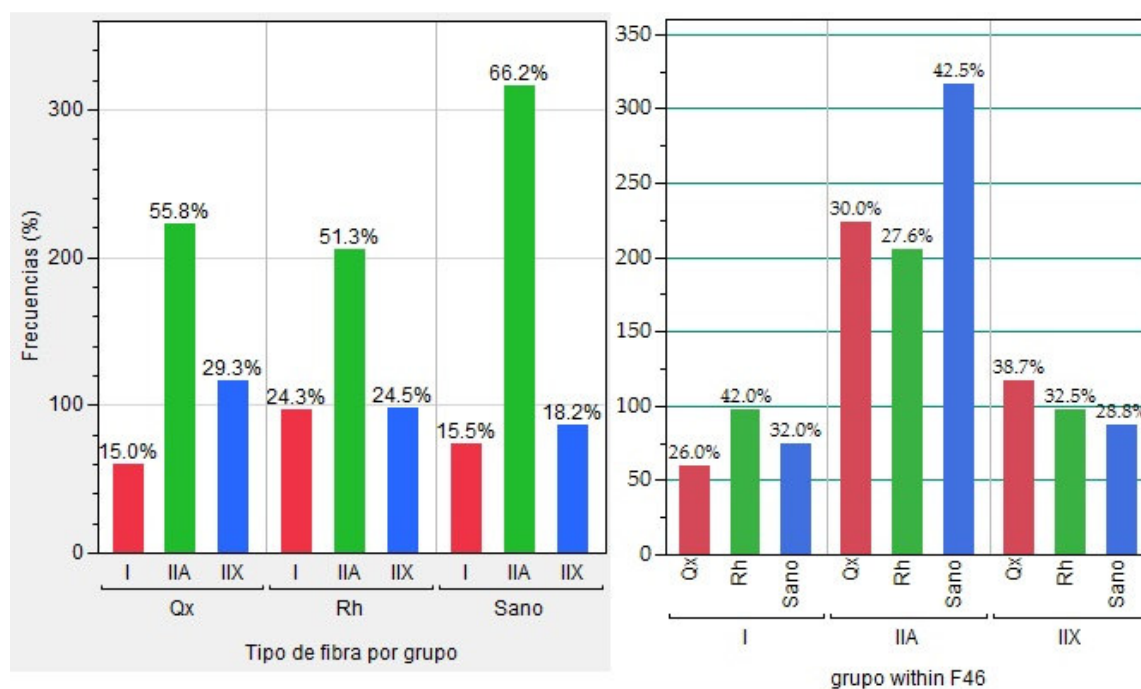


Figura 1. Distribución porcentual de fibras musculares en perros, en tres grupos experimentales.

Distribución de fibras musculares

La caracterización del tipo de fibra se realizó en base a la tinción histoquímica de M-ATPasa ácida, se obtienen tres niveles de tonalidad de la densidad óptica, la tinción más oscura de las fibras corresponde al tipo I, la intermedia a las IIX y las claras a las IIA, de acuerdo a este fundamento se obtuvo:

La mayor proporción observada de fibras musculares entre los grupos, correspondió al tipo IIA, la cual a fue máxima en el grupo Sano (42.4%), con respecto al grupo Qx (30%) y al grupo Rh (27.6%).

Las fibras tipo I se encontraron en mayor proporción en el grupo Rh (42%), mientras que en el grupo Sano tal proporción fue de 32% y mínima para el grupo Qx (26%).

En las fibras IIX se encontró mayor proporción en el grupo Qx (38.7%), intermedia en el grupo Rh (32.5%) y mínima en el grupo Sano (28.8%) respectivamente.

En términos generales se puede afirmar que independientemente del grupo de estudio, se encontró mayor densidad de fibras IIA que de otro tipo. Figura 1.

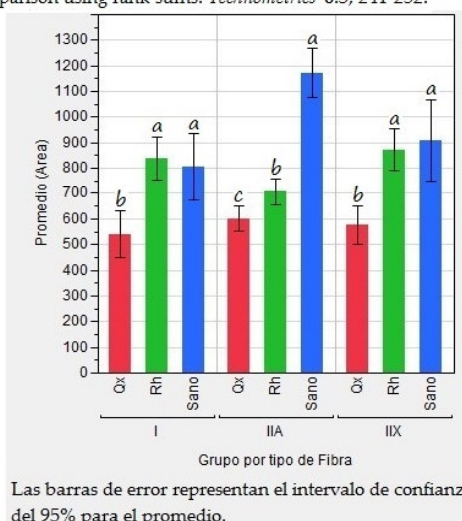
Cuadro 1, figura 2

Variable	Fibra ³	I			IIA			IIX		
	Estimador ¹ / Grupo ²	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh
Área	n	74	60	97	316	223	205	87	117	98
	Promedio	807.138	539.193	837.166	1171.79	601.34	706.74	907.355	574.424	872.656
	EE	65.633	45.793	42.919	49.37	25.342	26.331	80.687	38.174	41.744
	SR	8773.5	4936	13086.5	139185	64885.5	73070	14158	13538	18057
	RM	118.561	82.267	134.912	440.457	290.966	356.439	162.736	115.709	184.255
	χ^2	23.1655			64.8339			34.8831		
	P	< 0.0001			< 0.0001			< 0.0001		
	Comparación **	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*
	Sano - Qx	36.294	11.609681	3.126*	149.491	18.796301	7.953*	47.027	12.362263	3.804*
	Sano - Rh	16.351	10.314678	1.585 ^{NS}	84.018	19.2740229	4.359*	21.519	12.8631508	1.673 ^{NS}
Qx - Rh	52.645	10.976091	4.796*	65.473	20.7953629	3.148*	68.546	11.9576937	5.732*	

*. Diferencia significativa entre rangos medios (P < 0.05). Valor crítico: $q_{0.05(2),3} = 2.394$

NS: Diferencia no significativa entre rangos medios (P > 0.05)

** Análisis No paramétrico de comparaciones múltiples de rangos medios: prueba Dunn
Dunn OJ. Multiple comparison using rank sums. *Technometrics* 6:3, 241-252.



1. n: Número de observaciones en el grupo; Promedio: promedio aritmético de la variable; E.E.: Error estándar de la media; SR: Suma de rangos del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; RM: Rango medio del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; χ^2 : Valor del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; P: Probabilidad del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis.
2. Sano: Grupo de control, sin intervención experimental; Qx: Grupo experimental de sujetos con lesión, antes de la rehabilitación; Rh: Grupo experimental de sujetos con lesión, después de la rehabilitación.
3. Tipo de fibra muscular: I, IIA, IIX.
4. Las barras de error del gráfico representan el intervalo del 95% de confianza para el promedio del grupo.
Literales distintas en las barras del gráfico indican diferencias significativas entre los rangos medios de los grupos de una misma fibra muscular: P < 0.05

Área transversal

El promedio del área de las fibras tipo I de los grupos Rh y Sano, fue significativamente mayor con respecto al promedio del grupo Qx ($q_{Rh}=4.796$; $q_{Sano}=3.126$, $P < 0.05$), respectivamente; dichas diferencias no fueron significativas entre los grupos Sano y Rh ($q=1.585$, $P > 0.05$).

El promedio del área de las fibras IIA del grupo Sano fue significativamente mayor que el de los grupos Qx ($q=7.95$, $P<0.05$), y Rh ($q=4.359$, $P<0.05$); así mismo el promedio del grupo Rh fue mayor que el del Qx ($q=3.148$, $P<0.05$).

El comportamiento del promedio del área de las fibras tipo IIX, fue análogo al de las fibras I, observándose que el promedio de los grupos Rh y Sano, fue significativamente mayor que el del grupo Qx ($q_{\text{Sano}}=3.804$; $q_{\text{Rh}}=5.732$, $P<0.05$), respectivamente, no observándose diferencia entre los promedios del grupo Sano y Rh ($q= 1.673$, $P>0.05$). Cuadro 1, figura 2

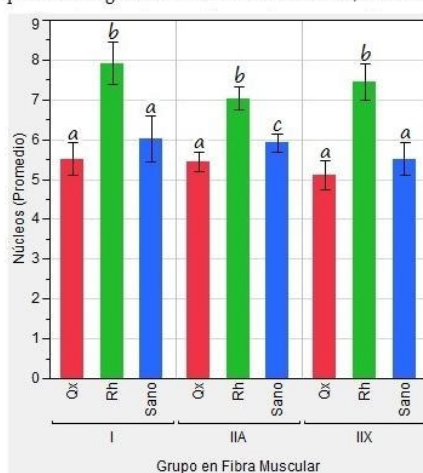
Cuadro 2, figura 3

Variable	Fibra ³	I			IIA			IIX		
	Estimador ¹ / Grupo ²	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh
Núcleos	Promedio	6.01361	5.51667	7.91753	5.91772	5.43049	7.03415	5.51724	5.11966	7.43878
	EE	0.28894	0.209204	0.2685	0.1191	0.12379	0.14983	0.21056	0.18377	0.22891
	SR	7296	5159	14341	112420	68717.5	96003	11855.5	13702.5	20195
	RM	98.595	85.983	147.845	355.758	308.15	468.307	136.27	117.115	206.071
	χ^2	39.7877			64.0256			60.2354		
	P	< 0.0001			< 0.0001			< 0.0001		
	Comparación **	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*
	Sano - Qx	12.612	11.609681	1.086 ^{NS}	47.608	18.796301	2.533*	19.155	12.362226	1.549 ^{NS}
Sano - Rh	49.25	10.314678	4.775*	112.549	19.274023	5.839*	69.801	12.863151	5.426*	
Qx - Rh	61.862	10.976091	5.636*	160.157	20.795363	7.702*	88.956	11.957694	7.439*	

* , Diferencia significativa entre rangos medios (P < 0.05). Valor crítico: $q_{0.05(2),3} = 2.394$

NS: Diferencia no significativa entre rangos medios (P > 0.05)

** Análisis No paramétrico de comparaciones múltiples de rangos medios: prueba Dunn
Dunn OJ. Multiple comparison using rank sums. *Technometrics* 6:3, 241-252.



1. n: Número de observaciones en el grupo; Promedio: promedio aritmético de la variable; E.E.: Error estándar de la media; SR: Suma de rangos del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; RM: Rango medio del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; χ^2 : Valor del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; P: Probabilidad del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis.
2. Sano: Grupo de control, sin intervención experimental; Qx: Grupo experimental de sujetos con lesión, antes de la rehabilitación; Rh: Grupo experimental de sujetos con lesión, después de la rehabilitación.
3. Tipo de fibra muscular: I, IIA, IIX.
4. Las barras de error del gráfico representan el intervalo del 95% de confianza para el promedio del grupo.
Literales distintas en las barras del gráfico indican diferencias significativas entre los rangos medios de los grupos de una misma fibra muscular: P < 0.05

Número de núcleos

El número de núcleos se vio afectado por la rehabilitación en los tres tipos de fibras, el promedio de los núcleos de las fibras tipo I de los grupos Rh y Sano, fue significativamente mayor con respecto al promedio del grupo Qx ($q_{Rh}=5636$; $q_{Sano}=4.775$, $P < 0.05$), respectivamente; dichas diferencias no fueron significativas entre los grupos Sano y Rh ($q=1.086$, $P > 0.05$).

Entre los tres grupos para las fibras IIA se observó menor número de núcleos en el grupo Qx y mayor en los grupos Sano y Rh ($q_{Qx}=2.533$; $q_{Sano}=7.702$; $q_{Rh}=5.839$, $P<0.05$), respectivamente.

Para las fibras IIX, del número de núcleos fue mayor en el grupo Rh con respecto a los grupos Sano y Qx, sin diferencia significativa entre estos dos últimos ($q_{Sano}=7.439$; $q_{Rh}=5.426$, $P<0.05$), respectivamente. Cuadro 2, figura 3.

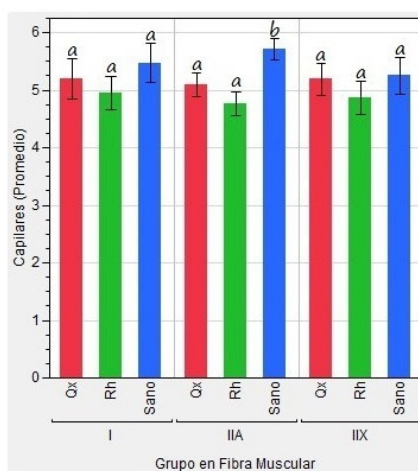
Cuadro 3, figura 4

Variable	Fibra ³	I			IIA			IIX		
	Estimador ¹ / Grupo ²	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh
Capilares	Promedio	5.47297	5.2	4.95876	5.70886	5.09417	4.76098	5.2587	5.18803	4.86735
	E.E	0.17126	0.17434	0.14576	0.09269	0.10454	0.10388	0.15954	0.13677	0.14185
	SR	9509.5	7009.5	10277	135092	78630.5	63417.5	13774	18567.5	13411.5
	RM	128.507	116.825	105.948	427.506	352.603	309.354	158.322	158.697	136.852
	χ^2	5.0372			41.7755			4.2741		
	P	0.0806			< 0.0001			0.118		
	Comparación**	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*
	Sano - Qx	11.682	11.609681	1.006 ^{NS}	74.903	18.796301	3.985*	0.375	12.362226	0.030 ^{NS}
	Sano - Rh	22.559	10.314678	2.187 ^{NS}	118.152	19.274023	6.130*	21.47	12.863151	1.669 ^{NS}
	Qx - Rh	10.877	10.976091	0.991 ^{NS}	43.249	20.795363	2.080 ^{NS}	21.845	11.957694	1.827 ^{NS}

*. Diferencia significativa entre rangos medios (P < 0.05). Valor crítico: $q_{0.05(2),3} = 2.394$

NS: Diferencia no significativa entre rangos medios (P > 0.05)

** Análisis No paramétrico de comparaciones múltiples de rangos medios: prueba Dunn
Dunn OJ. Multiple comparison using rank sums. *Technometrics* 6:3, 241-252.



1. n: Número de observaciones en el grupo; Promedio: promedio aritmético de la variable; E.E.: Error estándar de la media; SR: Suma de rangos del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; RM: Rango medio del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; χ^2 : Valor del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; P: Probabilidad del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis.
2. Sano: Grupo de control, sin intervención experimental; Qx: Grupo experimental de sujetos con lesión, antes de la rehabilitación; Rh: Grupo experimental de sujetos con lesión, después de la rehabilitación.
3. Tipo de fibra muscular: I, IIA, IIX.
4. Las barras de error del gráfico representan el intervalo del 95% de confianza para el promedio del grupo.
Literales distintas en las barras del gráfico indican diferencias significativas entre los rangos medios de los grupos de una misma fibra muscular: P < 0.05

Número de Capilares

No se observaron diferencias significativas en el promedio del número de capilares entre ninguno de los grupos de estudio en las fibras tipo I y IIX ($\chi^2=5.0372$, P=0.0806, $\chi^2=4.2741$, P=0.118) respectivamente. En las fibras IIA solo se observó diferencia significativa entre el grupo Sano y Qx (q=3.985, P<0.05) y el Sano y Rh (q=6.13, P<0.05) respectivamente, no observándose dicha diferencia entre el grupo Rh y QX (q=2.08, P>0.05). Cuadro 3, figura 4.

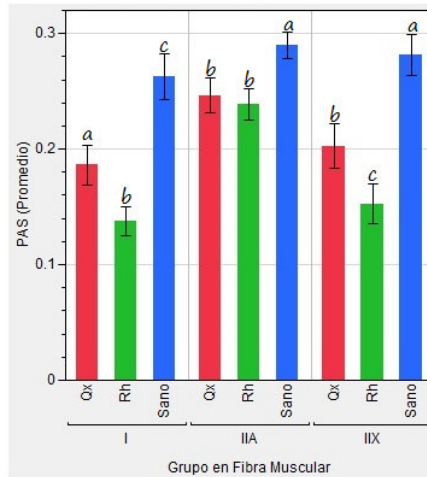
Cuadro 4, figura 5

Variable	Fibra ³	I			IIA			IIX		
	Estimador ¹ / Grupo ²	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh
PAS	Promedio	0.262725	0.18629	0.137946	0.290063	0.246387	0.238764	0.281625	0.202721	0.152659
	E.E	0.01007	0.00868	0.00623	0.00573	0.00733	0.00681	0.00904	0.00953	0.00852
	SR	12418	6992	7386	136181	74528	66431.5	18702	16824.5	10226.5
	RM	167.811	116.533	76.144	430.951	334.206	324.056	214.966	143.799	104.352
	χ^2	78.9852			40.8688			75.433		
	P	< 0.0001			< 0.0001			< 0.0001		
	Comparación**	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*
	Sano - Qx	51.278	11.609681	4.417*	96.745	18.796301	5.147*	71.167	12.362226	5.757*
	Sano - Rh	91.667	10.314678	8.887*	106.895	19.274023	5.5461*	110.614	12.863151	8.599*
	Qx - Rh	40.389	10.976091	3.680*	10.15	20.795363	0.488 ^{NS}	39.447	11.957694	3.299*

*. Diferencia significativa entre rangos medios (P < 0.05). Valor crítico: $q_{0.05(2),3} = 2.394$

NS: Diferencia no significativa entre rangos medios (P > 0.05)

** Análisis No paramétrico de comparaciones múltiples de rangos medios: prueba Dunn
Dunn OJ. Multiple comparison using rank sums. *Technometrics* 6:3, 241-252.



1. n: Número de observaciones en el grupo; Promedio: promedio aritmético de la variable; E.E.: Error estándar de la media; SR: Suma de rangos del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; RM: Rango medio del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; χ^2 : Valor del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; P: Probabilidad del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis.
2. Sano: Grupo de control, sin intervención experimental; Qx: Grupo experimental de sujetos con lesión, antes de la rehabilitación; Rh: Grupo experimental de sujetos con lesión, después de la rehabilitación.
3. Tipo de fibra muscular: I, IIA, IIX.
4. Las barras de error del gráfico representan el intervalo del 95% de confianza para el promedio del grupo.
Literales distintas en las barras del gráfico indican diferencias significativas entre los rangos medios de los grupos de una misma fibra muscular: P < 0.05

Densidad Óptica Tinción PAS

El promedio de la densidad óptica de la tinción de PAS se ve incrementada en las fibras I, IIA y IIX en el grupo de sanos.

Las fibras I muestran en promedio mayor densidad óptica de la tinción PAS en el grupo Sano/Krusk con respecto a las fibras de los grupos Qx (q=4.417; P<0.05) y Rh (q=8.887, P<0.05); en el grupo Qx fue mayor que en el de Rh (q=3.680, P<0.05), respectivamente.

Las fibras tipo IIA del grupo Sano tienen un mayor promedio de densidad óptica en la tinción PAS con una diferencia significativa respecto a los grupos Qx y Rh, ($q=5.147$; $P<0.05$) y ($q=5.546$; $P<0.05$), no observable entre los grupos Qx y Rh ($q=0.488$, $P>0.05$).

El promedio de la densidad óptica de la tinción PAS de las fibras IIX del grupo Sano fue significativamente mayor que el de los grupos Qx ($q=5.757$; $P<0.05$), y Rh ($q=8.599$; $P<0.05$), así mismo el promedio de grupo Qx fue mayor que el de Rh ($q=3.299$; $P<0.05$). Cuadro 4, figura 5.

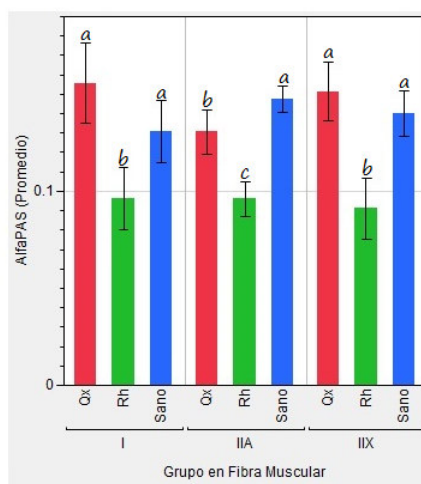
Cuadro 5, figura 6

Variable	Fibra ³	I			IIA			IIX		
	Estimador ¹ / Grupo ²	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh
αPAS	Promedio	0.130595	0.155736	0.09633	0.14727	0.130536	0.095928	0.140192	0.1521	0.091064
	E.E	0.00799	0.0102	0.00817	0.00338	0.00568	0.00439	0.00585	0.00767	0.00803
	SR	9362	8651	8783	142882	79341	54917	15295	20315	10143
	RM	126.514	144.183	90.546	452.158	355.789	267.888	175.805	173.632	103.5
	χ ²	26.5756			93.3303			43.8659		
	P	< 0.0001			< 0.0001			< 0.0001		
	Comparación **	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*
	Sano - Qx	17.669	11.609681	1.522 ^{NS}	96.369	18.796301	5.127*	2.173	12.362226	0.176 ^{NS}
	Sano - Rh	35.968	10.314678	3.487*	184.27	19.274023	9.561*	72.305	12.863151	5.621*
	Qx - Rh	53.637	10.976091	4.887*	87.901	20.795363	4.227*	70.132	11.957694	5.865*

*. Diferencia significativa entre rangos medios (P < 0.05). Valor crítico: $q_{0.05(2),3} = 2.394$

NS: Diferencia no significativa entre rangos medios (P > 0.05)

** Análisis No paramétrico de comparaciones múltiples de rangos medios: prueba Dunn
Dunn OJ. Multiple comparison using rank sums. *Technometrics* 6:3, 241-252.



1. n: Número de observaciones en el grupo; Promedio: promedio aritmético de la variable; E.E.: Error estándar de la media; SR: Suma de rangos del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; RM: Rango medio del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; χ^2 : Valor del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; P: Probabilidad del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis.
2. Sano: Grupo de control, sin intervención experimental; Qx: Grupo experimental de sujetos con lesión, antes de la rehabilitación; Rh: Grupo experimental de sujetos con lesión, después de la rehabilitación.
3. Tipo de fibra muscular: I, IIA, IIX.
4. Las barras de error del gráfico representan el intervalo del 95% de confianza para el promedio del grupo.
Literales distintas en las barras del gráfico indican diferencias significativas entre los rangos medios de los grupos de una misma fibra muscular: P < 0.05

Densidad Óptica Tinción αPAS

En el promedio de la densidad óptica de la tinción de αPAS no se observan diferencias significativas en las fibras I, entre los grupos Sano y de Qx ($q=1.522$; $P>0.05$), pero sí entre los grupos Sano y Rh, ($q=3.487$; $P<0.05$), y Qx y Rh ($q=4.887$; $P<0.05$), respectivamente. Entre los tres grupos para las fibras IIA, la mayor densidad óptica correspondió al grupo Sano, seguida del grupo Qx y la mínima para el grupo Rh ($q_{\text{Sano}}=9.561$, $q_{\text{Qx}}=5.127$; $q_{\text{Rh}}=4.227$, $P<0.05$),

respectivamente. Para la densidad óptica de las fibras IIX, los grupos sano y Qx no presentan diferencia significativa ($q=0.176$, $P>0.05$) y sí para los grupos Sano respecto a Rh y de este a Qx ($q_{Rh}=5.621$; $q_{Qx}=5.865$, $P<0.05$), respectivamente. Cuadro 5, figura 6.

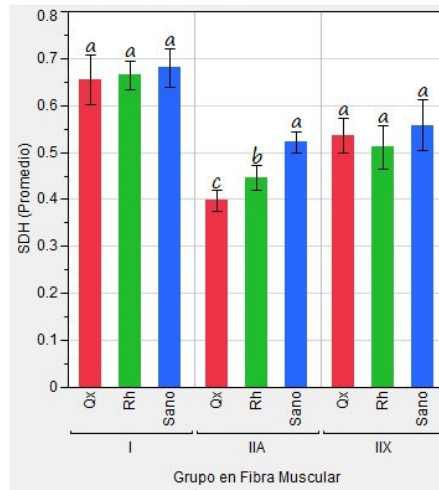
Cuadro 6, figura 7

Variable	Fibra ³	I			IIA			IIX			
	Estimador ¹ / Grupo ²	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh	
SDH	Promedio	0.680081	0.65529	0.66413	0.522066	0.397881	0.445802	0.558242	0.535994	0.511598	
	EE	0.02	0.01565	0.0264	0.01121	0.01109	0.01315	0.02739	0.01832	0.0235	
	SR	8941	7204	10651	138399	66684	72057.5	14185	17636	13932	
	RM	120.824	120.067	109.804	437.97	299.031	351.5	163.046	150.735	142.163	
	χ^2	1.4416			57.3405			2.6503			
	P	0.4864			< 0.0001			0.2658			
	Comparación**	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*	
		Sano - Qx	0.757	11.609681	0.065 ^{NS}	138.939	18.796301	7.392*	12.311	12.362226	0.996 ^{NS}
		Sano - Rh	11.02	10.314678	1.068 ^{NS}	86.47	19.274023	4.486*	20.883	12.863151	1.623 ^{NS}
		Qx - Rh	10.263	10.976091	0.935 ^{NS}	52.469	20.795363	2.523*	8.572	11.957694	0.717 ^{NS}

*. Diferencia significativa entre rangos medios (P < 0.05). Valor crítico: $q_{0.05(2),3} = 2.394$

NS: Diferencia no significativa entre rangos medios (P > 0.05)

** Análisis No paramétrico de comparaciones múltiples de rangos medios: prueba Dunn
Dunn OJ. Multiple comparison using rank sums. *Technometrics* 6:3, 241-252.



1. n: Número de observaciones en el grupo; Promedio: promedio aritmético de la variable; E.E.: Error estándar de la media; SR: Suma de rangos del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; RM: Rango medio del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; χ^2 : Valor del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; P: Probabilidad del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis.
2. Sano: Grupo de control, sin intervención experimental; Qx: Grupo experimental de sujetos con lesión, antes de la rehabilitación; Rh: Grupo experimental de sujetos con lesión, después de la rehabilitación.
3. Tipo de fibra muscular: I, IIA, IIX.
4. Las barras de error del gráfico representan el intervalo del 95% de confianza para el promedio del grupo.
Literales distintas en las barras del gráfico indican diferencias significativas entre los rangos medios de los grupos de una misma fibra muscular: P < 0.05

Densidad Óptica Tinción SDH

En cuanto a la densidad óptica de SDH entre grupos no se observan cambios significativos en las fibras I y IIX, aunque las fibras I presentaron un mayor promedio en la densidad óptica de SDH que los otros tipos de fibras; en las fibras tipo IIA, el grupo sano tuvo mayor densidad óptica de SDH respecto a los grupos Qx y Rh ($q_{Sano}=7.392$; $q_{Rh}=4.486$; $q_{Qx}= 2.523$, $P<0.05$), respectivamente. Cuadro 6, figura 7.

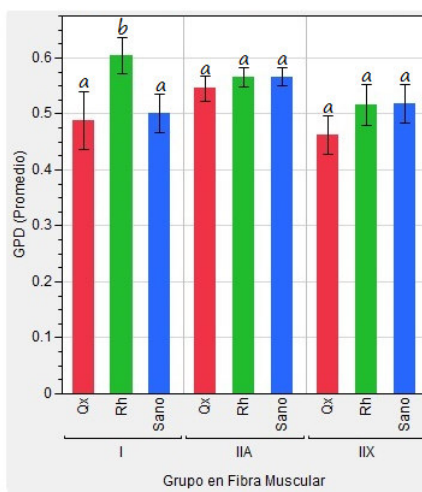
Cuadro 7, figura 8

Variable	Fibra ³	I			IIA			IIX		
	Estimador ¹ / Grupo ²	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh
GPD	Promedio	0.501187	0.488001	0.603876	0.566051	0.545507	0.566176	0.518107	0.46142	0.51558
	E.E	0.01747	0.02599	0.01605	0.00801	0.01168	0.0087	0.01686	0.01742	0.01875
	SR	7278	5948	13570	118912	79709	78519	13719	15930	16104
	RM	98.351	99.133	139.897	376.304	357.439	383.02	157.69	136.154	164.327
	χ^2	21.3865			1.6852			6.1649		
	P	< 0.0001			0.4306			0.0458		
	Comparación **	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*
	Sano - Qx	0.782	11.609681	0.067 ^{NS}	18.865	18.796301	1.004 ^{NS}	21.536	12.362226	1.742 ^{NS}
	Sano - Rh	41.546	10.314678	4.028*	6.716	19.274023	0.348 ^{NS}	6.637	12.863151	0.516 ^{NS}
	Qx - Rh	40.764	10.976091	3.714*	25.581	20.795363	1.230 ^{NS}	28.173	11.957694	2.356 ^{NS}

*. Diferencia significativa entre rangos medios (P < 0.05). Valor crítico: $q_{0.05(2),3} = 2.394$

NS: Diferencia no significativa entre rangos medios (P > 0.05)

** Análisis No paramétrico de comparaciones múltiples de rangos medios: prueba Dunn
Dunn OJ. Multiple comparison using rank sums. *Technometrics* 6:3, 241-252.



1. n: Número de observaciones en el grupo; Promedio: promedio aritmético de la variable; E.E.: Error estándar de la media; SR: Suma de rangos del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; χ^2 : Valor del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; P: Probabilidad del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis.
2. Sano: Grupo de control, sin intervención experimental; Qx: Grupo experimental de sujetos con lesión, antes de la rehabilitación; Rh: Grupo experimental de sujetos con lesión, después de la rehabilitación.
3. Tipo de fibra muscular: I, IIA, IIX.
4. Las barras de error del gráfico representan el intervalo del 95% de confianza para el promedio del grupo.
Literales distintas en las barras del gráfico indican diferencias significativas entre los rangos medios de los grupos de una misma fibra muscular: P < 0.05

Densidad Óptica Tinción GDP

En las fibras I solo se observó diferencia significativa entre el grupo Sano y Rh ($q=4.028$, $P<0.05$) Qx y Rh ($q=3.714$, $P<0.05$) respectivamente, no así entre el grupo Sano y QX ($q=0.067$, $P>0.05$); tampoco se observaron diferencias significativas en el promedio de la densidad óptica de GDP entre ninguno de los grupos de estudio en las fibras tipo IIA y IIX ($\chi^2=1.6852$, $P=0.4306$, $\chi^2=6.1649$, $P=0.0458$) respectivamente. Cuadro 7, figura 8.

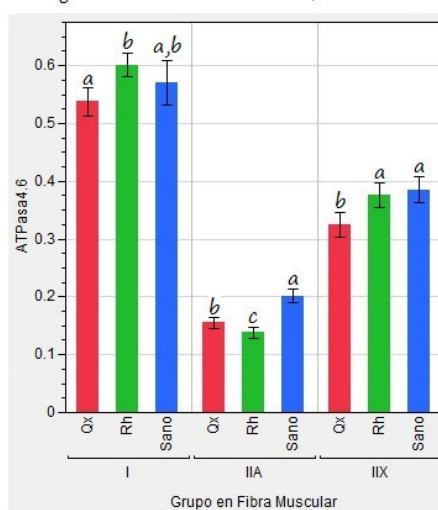
Cuadro 8, figura 9

Variable	Fibra ³	I			IIA			IIX		
	Estimador ¹ / Grupo ²	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh	Sano	Qx	Rh
ATPasa4.6	Promedio	0.501187	0.488001	0.603876	0.566051	0.545507	0.566176	0.518107	0.46142	0.51558
	EE	0.01747	0.02599	0.01605	0.00801	0.01168	0.0087	0.01686	0.01742	0.01875
	SR	7278	5948	13570	118912	79709	78519	13719	15930	16104
	RM	98.351	99.133	139.897	376.304	357.439	383.02	157.69	136.154	164.327
	χ^2	10.3114			51.9681			12.2841		
	P	0.0058			< 0.0001			0.0022		
	Comparación**	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*	Diferencia	EE.Dif.	q*
	Sano - Qx	20.341	11.609681	1.752 ^{NS}	74.81	18.796301	3.980*	38.982	12.362226	3.153*
Sano - Rh	14.866	10.314678	1.441 ^{NS}	136.951	19.274023	7.105*	5.937	12.863151	0.461 ^{NS}	
Qx - Rh	35.207	10.976091	3.206*	62.141	20.795363	2.988*	33.045	11.957694	2.763*	

*. Diferencia significativa entre rangos medios (P < 0.05). Valor crítico: $q_{0.05(2),3} = 2.394$

NS: Diferencia no significativa entre rangos medios (P > 0.05)

** Análisis No paramétrico de comparaciones múltiples de rangos medios: prueba Dunn
Dunn OJ. Multiple comparison using rank sums. *Technometrics* 6:3, 241-252.



- n: Número de observaciones en el grupo; Promedio: promedio aritmético de la variable; E.E.: Error estándar de la media; SR: Suma de rangos del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; RM: Rango medio del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; χ^2 : Valor del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis; P: Probabilidad del estadístico ji-cuadrada del contraste Wilcoxon/Kruskal-Wallis.
- Sano: Grupo de control, sin intervención experimental; Qx: Grupo experimental de sujetos con lesión, antes de la rehabilitación; Rh: Grupo experimental de sujetos con lesión, después de la rehabilitación.
- Tipo de fibra muscular: I, IIA, IIX.
- Las barras de error del gráfico representan el intervalo del 95% de confianza para el promedio del grupo.
Literales distintas en las barras del gráfico indican diferencias significativas entre los rangos medios de los grupos de una misma fibra muscular: P < 0.05

Densidad Óptica Tinción m-ATPasa

En el promedio de la densidad óptica de la tinción de m-ATPasa no se observan cambios significativos en las fibras I, del grupo Sano y de Qx ($q=1.752$; $P>0.05$), ni entre los grupos Sano y Rh, ($q=1.441$; $P>0.05$); entre Qx y Rh si hay cambio ($q=43.206$; $P<0.05$). En los tres grupos para la fibra IIA, la mayor densidad óptica correspondió al grupo Sano, intermedia para el grupo

Qx y mínima para el de Rh ($q_{\text{Sano}}=7.105$, $q_{\text{Qx}}=3.980$; $q_{\text{Rh}}=2.988$, $P<0.05$), respectivamente. Entre los grupos Sano y Rh no hubo diferencia significativa en la densidad óptica de las fibras IIX, ($q=0.461$, $P>0.05$) y sí para los grupos Sano respecto Qx y de este a Rh ($q_{\text{Rh}}=3.153$; $q_{\text{Qx}}=2.763$, $P<0.05$), respectivamente. Cuadro 8, figura 9.

7. DISCUSIÓN

La finalidad del presente estudio tiene como primer objetivo obtener una base de datos del músculo en condiciones normales que sirva de comparación para conocer las modificaciones que existen cuando hay alteraciones en la biomecánica de la marcha y posteriormente observar si hay una influencia que pueda revertir dicha alteración al aplicar un estímulo, como lo es el ejercicio moderado en la rehabilitación física.

CARACTERIZACIÓN DE LA FIBRA MUSCULAR EN PERROS SANOS

La caracterización histológica y metabólica del músculo del perro, ha tenido históricamente controversias, la composición fibrilar descrita incluye fibras tipo I y tipo II, de estas últimas se conoce que, además de no ser descritas como las clásicas encontradas en otras especies, hay algunas que son localizadas en sitios específicos como la de los músculos periorbitales fibras IIO, las de los músculos maseteros, fibras IIM (Mascarello 1982, Bubb 1986), las encontradas en perros muy jóvenes o en posibles estados de transición las fibras IIC (Gil 1986), las fibras II Dog o propias del perro que podrían corresponder a las IIB descritas en otras especies (Latorre y col,1993) o las IIB en los músculos laríngeos, Smerdu (2005), encuentra que por electroforesis e inmunohistoquímica se identifican como fibras lentas MyHC-I, una intermedia como MyHC-IIX y la más lenta de las II isoformas como MyHC-IIA, e indica que no hubo fibras que fueron reconocidas por anticuerpos IIB, por lo que concluye en los músculos largos de los perros no se encuentran fibras IIB; Toniolo (2007) describe la caracterización actual que se ha basado en la comparación de los estudios anteriores con la utilización de histoloquímica e inmunohistoquímica y expresión de mRNA y niveles de proteína, dejando respuestas definitivas sobre la identificación de las isoformas de miosina y tipo de fibras del músculo perro, que identifica fibras puras I, IIA, IIX, IIB e híbridas,

IIA-IIX, y IIX-IIB, aunque habrá que considerar también las fibras tipo IIC, que según Acevedo (2006) es una isoforma híbrida que co-expresa las isoformas MyHC-I/IIA o la isoforma MyHC-IIA/IIX que se comporta en la histoquímica como las caracterizadas por Latorre (1993) como IID o IIP, cuyo valor estriba en ser transicionales en estados de adaptación muscular, como el crecimiento o el cambio de actividad muscular- desuso o aumento de ejercicio.

Ahora no hay que dejar de lado las observaciones de Mascarello (1986) la presencia de grupos estables de fibras tipo IIC, hace patente que las necesidades de transformación muscular para poder adaptarse continuamente a diferentes demandas musculares.

Para esta investigación identificamos que, de la proporción de fibras tipo II, se encuentran en mayor cantidad las fibras tipo IIA y después las IIX. Se observa que en las tinciones para detectar la velocidad de contracción con la actividad fibrilar frente a la m-ATPasa se comprobó que a pH 4.6, las fibras IIA tienen mayor tinción que las IIX, por lo que de acuerdo a los trabajos de Smerdu (2005), Acevedo (2006), Strbenc (2006), Toniolo y Maccatrozo (2007) establecimos este tipo de clasificación, ya que encontramos los mismos datos.

Al determinar las características del músculo semitendinoso en condiciones normales se encontraron similitudes entre la composición de los tipos de fibras musculares con los descritos por Parsons (1985) y Armstrong (1982). Los cuales describen que hay una proporción mayor de fibras tipo II, más del 28%, sobre las fibras I, Acevedo y Rivero (2006) indican del 30-50% e incluso más de acuerdo a los estudios de Strbenc (2004), como lo encontramos en estos perros clínicamente sanos, en los que la mayor proporción fue de fibras IIA. Aunque la literatura marca que se encuentra una mayor cantidad de fibras tipo I en músculos profundos, con una actividad extensora (músculos anti gravitacionales), que realizan mayor trabajo cuando el perro está en cuadripedestación, estos mismos músculos en la superficie tienen menos fibras tipo I (Strbenc 2004). Por lo que asumimos que al tomar las biopsias de la superficie del músculo semitendinoso encontramos este patrón de distribución ya descrito, menor proporción de fibras I.

De las técnicas para detectar el metabolismo, se observa que las fibras muestran una actividad de moderada a altamente oxidativa, esto lo presentan las fibras en este orden: tipos IIX< IIA<I. La capacidad glucolítica es baja en las fibras tipo I porque no tuvieron una tinción evidente en la técnica con α GPDH y un poco mayor en los tipos II, como lo describe Acevedo (2006).

El tamaño fibrilar está relacionado al tipo fibrilar, teniendo en consideración las investigaciones que han arrojado que las fibras tipo I son más pequeñas, las fibras tipo II son de gran diámetro y entre estas, las IIA presentan mayor tamaño, ahora es conocido que la población fibrilar está influenciada por la actividad funcional del músculo, (Snow 1982) por lo tanto el tamaño también. El músculo semitendinoso, tiene la función de extender la articulación coxofemoral y tarsal, además se encarga de la flexión de la articulación femorotibiopatelar por lo que tiene mayor importancia la función locomotora que la postural, así que observamos esta relación en el tamaño y tipo de fibra: mayor proporción de fibras IIA, grandes y de elevado potencial oxidativo.

El número de núcleos es diferente en los tres tipos de fibras, mayor en las fibras tipo I y disminuye en las fibras tipo II, teniendo menos cantidad las fibras tipo IIX, y está correlacionado con el número de capilares, es decir mayor en las fibras tipo I las cuales presentan mayor capacidad oxidativa, con lo que podemos relacionar la vascularidad con el metabolismo oxidativo. La densidad óptica de la tinción α -PAS se vio incrementada en las fibras tipo II, respecto a las fibras tipo I. Esto indica el contenido de glucógeno y reserva energética, que se observa con una mayor densidad en las fibras II.

La caracterización de las fibras por medio de la técnica m-ATPasa a PH 4.6 y 10.4, se relacionan con los resultados de Strbenc (2004) quien concluye que las discrepancias en la clasificación de los tipos de fibras en función de su actividad m-ATPasa, son probablemente debido al contenido variable de las isoformas.

CAMBIOS EN FIBRAS DEL MÚSCULO CON LESION Y DESPUÉS DEL EJERCICIO

La diversidad fenotípica del perfil de las fibras musculares está dada genéticamente y para mantener esas propiedades, se hace necesario tener influencias neurales y mecánicas (Hoh JF1991). Las intervenciones del sistema neuromuscular que alteran los patrones de actividad de las fibras musculares pueden ser, modificación en la carga o campo gravitacional, remoción de la sinergia, lesión de nervio periférico, desuso, por dolor o inmovilización, estas alteran su fenotipo (Ohira Y 2006). Los sujetos del grupo (Qx) con lesiones y posterior cirugía correctiva por alteración ortopédica tuvieron una disminución en el número de células tipo IIA, respecto al grupo sanos y todavía menor proporción en el grupo de rehabilitados, la proporción de fibras IIA en este grupo se ve disminuida al no haber actividad normal y se ve incrementado el número de fibras IIX, al ser esta una tendencia esperada al reiniciar la actividad con el ejercicio moderado, ya en el grupo de rehabilitados las fibras tipo I se ven incrementadas con respecto a los sujetos sanos, este incremento de las fibras tipo I, se explica porque debido a la función del músculo, se observa esa relación y el incremento de las fibras tipo I lo podemos relacionar con el ejercicio moderado que implica esfuerzo y tiempo continuos,

En cuanto al comportamiento de la medida de área transversal, en la que se observa un menor promedio en todos los tipos de fibras del grupo Qx, esta transformación se explica con el cambio de actividad, disminución de la carga de peso sobre el miembro afectado, por dolor y/o la intervención quirúrgica y la consecuente falta de uso posterior, lo que lleva también a explicar la atrofia clínica en ellos (Brandt 2003) por disminución del área transversal de la fibra; ya posterior a la rehabilitación se observa el incremento del área, en todos los tipos fibrilares, siendo evidente la cercanía a valores semejantes entre los grupos Rh y Sanos, asumiendo que por el ejercicio casi llegan a valores normales, creemos que al utilizar el ejercicio como estímulo, observamos un

incremento generalizado o reversión del tamaño fibrilar, aunque sin llegar a los parámetros normales, con excepción del tamaño original de las fibras tipo I encontrado en los sujetos sanos, en las que no hay diferencia con las del grupo Rh, sí tenemos en consideración que en los estadios juveniles y de transición se encuentran fibras de gran tamaño que desaparecen o son precursoras de los estadios definitivos (Gil, 1987) se explica que el encontrar fibras de gran tamaño pudieran ser de transición, en este caso, lo relacionamos al estímulo del ejercicio moderado, para obtener un patrón similar al grupo control quizá el estímulo debe ser mantenido por más tiempo y tomar la biopsia en un periodo mayor a 8 semanas,

Se observa que hubo un cambio en la cantidad de núcleos, del grupo Sano al grupo Qx se encuentra una disminución en el número de núcleos lo que se espera por la falta de movimiento y atrofia de la fibra muscular, posterior a la rehabilitación se encuentra mayor cantidad de núcleos como respuesta a la demanda funcional a la que se le ha expuesto, la mayor parte de la literatura indica que bajo condiciones en las que las fibras están cambiando como en el crecimiento, ejercicio ó hipertrofia el número de núcleos se incrementa, por lo que sí se ve que la rehabilitación si ha afectado el numero de núcleos.

La cantidad de capilares de las fibras I y IIX no se vio afectada en ninguno de los tres grupos de estudio, en la fibra IIA si hubo la disminución del promedio del numero de capilares, comparativamente entre los Sanos y los del grupo Qx y entre los Sanos y los Rh, esta tendencia se explica porque se ha encontrado, que hasta después de tres semanas de inmovilización se observa un decremento en la densidad vascular y un incremento en esta después de 8 semanas de iniciado el retorno de actividad, por lo que podemos inferir que los pacientes del grupo Qx no tenían mucho tiempo con la inmovilidad y/o lesión traumática.

En cuanto al metabolismo se encontraron también diferencias entre los grupos, las fibras tipo I tienen mayor metabolismo oxidativo que las fibras tipo II, y las fibras tipo II mayor metabolismo glucolítico, en cuanto al contenido relativo de glucógeno, en la tinción de α -PAS se observa que en el grupo con alteración

ortopédica las fibras I tienen una menor cantidad de glucógeno, respecto a las fibras tipo II, de manera general, por lo que se observa que el metabolismo oxidativo y glucolítico se mantienen de acuerdo al tipo de fibra, aunque se encontraron que algunas propiedades contráctiles de las fibras no tienen correlación con las características histoquímicas y se explica que en la disminución de la actividad puede haber mayor reservorio energético, que después fue utilizado en el periodo de ejercicio moderado como se ve en los datos del grupo posterior a la rehabilitación, Durante la inmovilización o desuso existen cambios bioquímicos como lo encontramos: el contenido de carbohidratos totales y glucógeno decayó en todos los tipos fibrilares de los músculos sin actividad normal, con la rehabilitación se observa una ligera disminución atribuible a la actividad y gasto energético, mayor utilización de ácidos grasos y disminución del metabolismo de carbohidratos (Hoppeler 1986).

Posterior a la rehabilitación se encontró que hubo un aumento en la cantidad de fibras tipo I y tipo IIX, con el ejercicio moderado las fibras musculares adquieren una mayor capacidad de difusión oxidativa, además de que algunas fibras obtienen mayor potencia contráctil, el entrenamiento lleva a una pérdida de capacidad glucolítica al adquirir una moderada capacidad oxidativa como lo demuestra el incremento de las fibras tipo I con mayor actividad oxidativa, aunque también se observa un cambio en el metabolismo oxidativo en las fibras IIA de los tres grupos los grupos, baja cuando se da el periodo de inmovilidad y se recupera con el ejercicio.

El metabolismo Glucolítico fue mayor en las fibras II, con excepción de las fibras Tipo I en el grupo Rh, donde se observa una mayor capacidad glucolítica, quizá debido al incremento de actividad y cambio en la composición fibrilar, ya mencionada antes.

La densidad óptica de ATPasa ácida, que sirvió para identificar a los tipos fibrilares, muestra que para las fibras I se obtuvieron tinciones oscuras, para las IIA claras y para las IIX intermedias. Aunque es posible que se encuentren alrededor de 30% de fibras híbridas, que no se puedan categorizar en solo

estos tres tipos de fibras, por haber un amplio espectro de reacciones, por los contenidos diferenciales de MyHC expresadas en las fibras híbridas.

También se espera en individuos estimulados con el ejercicio, un incremento de la densidad mitocondrial, actividad enzimática oxidativa y glucolítica y lípidos intracelulares, por lo tanto los músculos tendrán más resistencia a la fatiga con este tipo de ejercicio, además con mayor tiempo de exposición también se espera la formación de nuevos capilares que incrementan la difusión de oxígeno y disminuyen la distancia sobre la cual puede difundir con mayor eficacia, por lo que no se observa un cambio evidente en el área de la fibra. (Bebout 1993). Se deberá tomar en cuenta la variabilidad regional en la composición fibrilar, así como el estrés impuesto que puede ser el ejercicio en toda planeación de la investigación.

8. CONCLUSIONES

La rehabilitación en nuestros sujetos de investigación, generó cambios en los tipos celulares, estructurales y metabólicos como se esperaba con este protocolo de ejercicio moderado. Hay evidencia de que el tamaño de la fibra muscular de un animal normal, está influenciado por la madurez (edad), función del músculo, tamaño y tamaño esperado de adulto, ejercicio ó actividad que realiza y el estado nutricional. Se encontró un aumento, en las fibras tipo I, debido a un posible aumento de actividad de este tipo de fibras y una reducción la cantidad de fibras IIA por el tiempo en desuso, debido a las lesiones traumáticas, aún durante la rehabilitación no se alcanza el factor en el ejercicio o el tiempo para que estimule a este tipo de fibras rápidas.

El aumento de núcleos en los sujetos rehabilitados nos indica que el programa de ejercicio, está induciendo cambios, al haber mayor número de núcleos en la célula muscular, hay mayor transcripción de proteínas y por consiguiente se dan estos cambios estructurales y metabólicos.

Los cambios metabólicos que encontramos entre los sujetos de cirugía y los rehabilitados, es que regresan a su actividad metabólica, casi al funcionamiento de un animal sano, con este protocolo de ocho semanas de rehabilitación física, por lo que aceptamos la hipótesis establecida en el trabajo, encontramos que la inactividad disminuye la función de las fibras musculares y un protocolo de entrenamiento controlado revierte las alteraciones generadas por una lesión traumática y creemos que este estudio sirve de base para continuar la investigación con un mayor periodo en el programa de rehabilitación (ejercicio moderado) que permita ver cambios estructurales contundentes y completos de la fibra, es decir cómo y con qué características se va produciendo la adaptación muscular.

9. FUENTES BIBLIOGRAFICAS

1. Acevedo LM, Rivero JL. New insights into skeletal muscle fiber types in the dog with particular focus towards hybrid myosin phenotypes. *Cell Tissue Res* 2006; 323:283-303.
2. American Physical Therapy Association (APTA). *Guide to Physical Therapy Practice*, 2nd Edition, *Phys Ther* 2001; 81: 9-746.
3. Armstrong RB CW, Seeherma HJ, Taylor CR. Distribution of fiber types in locomotory muscles of dogs. *Am J Anat* 1982;163:1,87-98
4. Baldwin et al, *Skeletal Muscle Plasticity*. *Am J Phys Med Rehabil* 2002; 81:11 40-51
5. Banks W. J., *Histología veterinaria aplicada*. Manual Moderno. México 1986.
6. Bebout D.E et al, *Effects of training and immobilization on VO₂ and DO₂ in dog gastrocnemius muscle in situ*. *J American Physiological Society* 1993;1697-1703
7. Bergstrom J. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand J Clin Lab Invest* 1975; 35:7, 609-616.
8. Bigard A.X. et al. Influence of overload on phenotypic remodeling in regenerated skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: 1686-1694
9. Blanco CE, Sieck G C, Edgerton VR. Quantitative histochemistry determination of succinil dehydrogenase activity in skeletal muscle fibers. *Histochem J* 1988; 24:431-444
10. Bockstahler B. *Iams Clinical Nutrition Symposium, The orthopedic patient: conservative treatment, physiotherapy and rehabilitation*. Suiza 2006
11. Brandt K, *Response of joint structures to inactivity and to reloading after immobilization*. *Arthritis Rheum* 2003; 49: 2, 267-271

12. Brinker, Piermattei, Flo. Manual de ortopedia y reparación de fracturas de pequeños animales. 3ª Ed. Mc Graw Hill Interamericana. España 1997.
13. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fibre types: how many and what kind? Arch Neurol 1970; 23:369-379
14. Bubb W, Sims M. Fiber type composition of rostral and caudal portions of the digastrics muscle in the dog. Am J Vet Res 1986 ; 47:8, 1834-1840
15. Budsberg C. Steven. Small Animal – Orthopedics. Treatment of joint injuries. Florida 2005
16. Cameron MH. Physical Agents in Rehabilitation: From Research to Practice. WB Saunders, Philadelphia 1999
17. Carter S. Outpatient Physical Therapy for Musculoskeletal Conditions. Phys Ther 2007; 87:5, 497-512
18. Castle ME, Reyman TA. The effect of tenotomy and tendon transfer on muscle fiber types in the dog. Clin Orthop 1984;186:302-310
19. Cup EH, Pieters AJ, Ten Broek-Pastoor JM, Munneke M, Van Engelen BG, Hendricks HT, Van Der Wilt GJ, Oostendorp RA. Exercise therapy and other types of physical therapy for patients with neuromuscular diseases: A systematic review. Archives of physical medicine and rehabilitation. 2007; 88:11,1452-1464
20. Dellmann HD, Textbooks of Veterinary Histology Blackwell Publishing sixth edition 1994
21. Dubowitz Muscle Biopsy: A practical approach. Elsevier Saunders third ed 2007; 41-247
22. Dunn OJ, Multiple comparison using rank sums. Technometrics 6:3, 241-252
23. Evans Howard E. Disección del perro. McGraw Hill Interamericana 5ta ed 2002
24. Fitts RH, Widrick JJ. Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. Exerc Sport Sci Rev 1996; 24:427-73.
25. Fossum WT. Cirugía en pequeños animales. Intermedica. Argentina 2004

26. Flück M. Review functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *The journal of experimental Biology*. 2006; 209: 2239-2248
27. Gázquez OA, Blanco R A., *Tratado de histología veterinaria*. Masson. España 2004
28. Gil F *Diferenciación postnatal de los tipos de miofibrillas de algunos músculos del perro*. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, España 1986
29. Gunn H M. Differences in the histochemical properties of skeletal muscles of different breeds of horses and dogs. *J Anat* 1978;127,3 : 615-634
30. Gundersen K, Bruusgaard J. Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost? *J Physiology* 2008; 586:11, 2675-2681
31. Guyton, Arthur C. *Textbook of medical physiology* Elsevier Saunders, 11th ed. 2006
32. Hoh Joseph F. Regulation miogenica of the mammalian skeletal muscle fiber. *News in Physiological Sciences*. 1991; 6: 1-6
33. Hopperler Hans, Fluck Martin. Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology*. 2002; 205: 2143-2152
34. Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10:332-337.
35. Kuzon W. et al. Acomparative Histochemical and Morphometric Study of Canine Skeletal Muscle. *Can J Vet Res* 1989; 53: 125-132
36. Latorre R. et al. Skeletal muscle fiber types in the dog. *J Anatomy*. 1993;182 :329-337
37. Lieber RL, McKee-Woodburn T. Recovery of the dog quadriceps after 10 weeks of immobilization followed by 4 weeks of remobilization. *J Orthop Res*. 1989; 7 (3):408-412

38. Lindholm A, Pihel K. Fibre composition, enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes in muscles of standardbred horses. *Acta Vet Scand* 1974; 15:28-309.
39. López JL, Quiroz E. Diversidad Celular y naturaleza dinámica del músculo esquelético. Investigación. Decanato de la Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. 2001; 84-95609-09-6:339-350.
40. Matis U. Femoral head and neck fractures in cats. 12th ESVOT Congress, Munich Alemania 2004.
41. Matis U. The Feline Fracture Patient. Proceedings Southern European Veterinary Conference. Publisher SEVC. 2007. Alemania
42. McGowan CM, Goff LS, Narelle, . *Animal physiotherapy: Assessment, treatment and rehabilitation of animals*. Blackwell 2007
43. Millis DL. Getting the dog moving after surgery. *Journal of the American Animal Association*. 2004; 40:429-436
44. Millis DL, Levine D, Taylor A, *Canine rehabilitation physical therapy*. Saunders, El Sevier 2004. España.
45. Millis, DL. *Veterinary technician. Physical therapy techniques II*. 2005. Florida.
46. Nunamaker D, Blauner P. Normal and abnormal gait. *Textbook of Small Animal Orthopaedic*. 1989.
47. Ohira Y, Yoshinaga T, Ohara M, Kawano F, Wang XD, Higo Y, Terada M, Matsuoka Y, Roy RR, Edgerton VR The role of neural and mechanical influences in maintaining normal fast and slow muscle properties. *Cells Tissues Organs*. 2006; 182(3-4):129-142.
48. Parsons D T, Musch RL, Moore GC. Dynamic exercise training in foxhounds II. Analysis of skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1985; 59:190-197,
49. Pette D, Peuker H, Staron RS. The impact of biochemical methods for single muscle fiber analysis. *Acta Physiol Scand*. 1999; 166 (4)261-77.
50. Piras A. Fractures in skeletal immature dogs. Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference. 2007. Florida.

51. Randall B. F, et al., Muscle injuries in dogs. *The Compendium Small Animal*. 1997;19: 8
52. Riley DA, Bain JL Bollinger K, Kline K. An Overview of the Small Animal Practitioner. *Iowa State University Veterinarian* 2000; 62:1.
53. Rivero JL, Diz A, Toledo M, Agüera E. Enzyme-histochemical profiles of fiber types in mature canine appendicular muscles. *Anat Histol Embryol*. 1994; 23(4):330-336.
54. Rivero JL Muscle biopsy as a tool for assessing muscular adaptation to training in horses. *Am J Vet Res* 1996: 57:1412-1416.
55. Rivière S. *Veterinary Focus*. Physiotherapy for cats and dogs applied to locomotor disorders of arthritic origin. Scientific Communication, Royal Canin Research Center, Aimargues. 2007; 17:3.
56. Schiaffino S, Reggiani C Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*.1996:76:371-373.
57. Shelton GD, Engvall E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. *Neuromuscul Disord*. 2005; 15(2):127-38.
58. Sida M E, Ridaura S C, Romero J V. Manual del curso de histoquímica enzimática. Instituto Nacional de Pediatría. México. 1995.
59. Snow D, Billeter F, Mascarello F, Carpenne E, Jenny E. No classical Type IIB fibers in dog skeletal muscle. *Histochem*. 1982:75:53-65
60. Steiss JE. Muscle disorders and rehabilitation in canine athletes. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2002; 32(1):267-85.
61. Strbenc M, Smerdu V, Tozon N, Fazarinc G. Pattern of myosin heavy chain isoforms in different fiber types of canine trunk and limb skeletal muscle *Cells Tissues Organs*. 2004;176(4):178-186
62. Strbenc M, Changes In Histochemical Properties Of Muscle fibers In Developing Canine Skeletal Muscles *Slov Vet Res* 2005; 42 (3/4): 89-100

63. Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Muscle fibers types and function. *Curr Opin Rheumatol.* 1993; 5:695-705.
64. Taylor J, Tangner CH. Acquired muscle contractures in the dog and cat. A review of the literature and case report. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2007; 20(2):79-85.
65. Toniolo L, Maccatrozo L, Patruno M, Pavan E, Caliaro F, Rossi R, Rinaldi C, Canepari M, Reggiani C, Mascarello F. Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, 292:C1915-C1926

10 ANEXO TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS

HEMATOXILINA Y EOSINA

Utilizada para verificar la disposición transversal de las fibras musculares, confirmar ausencia de artefactos por congelación y analizar la morfología de los miocitos. Se observan los núcleos teñidos de azul, las fibras color rosa y el tejido conectivo de color rosa claro.

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| 1.- Hematoxilina de Harris | 3-6 minutos |
| 2.- Lavar 3 veces en agua destilada | |
| 3.- Eosina al 1% | 30-60 segundos |
| 4.- Deshidratar en alcoholes: | |
| 70° | 1 minuto |
| 90° | 1 minuto |
| 100° | 1 minuto |
| 100° | 1 minuto |
| 5.- Aclarar con xilol | 2 baños de 1 minuto cada uno |
| 6.- Montar en medio sintético | |

TINCIÓN PAS (Ácido de Schiff)

La tinción del glucógeno en las fibras se demuestra con esta técnica, es menos evidente la diferenciación entre las distintas fibras que con otras tinciones.

- | | |
|--|------------|
| 1.- Fijar en Acético-Etanol | 10 minutos |
| 2.- Lavar en agua | |
| 3.- Sumergir en Ácido Periódico 5% | 5 minutos |
| 4.- Lavar en agua | |
| 5.- Sumergir en reactivo de Schiff | 15 minutos |
| 6.- Lavar en agua corriente | 10 minutos |
| 7.- Hematoxilina de Harris | 1 minuto |
| 8.- Lavar en agua corriente | 5 minutos |
| 9.-Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes, aclarar con xilol y montar en medio sintético. | |

α -amilasa PAS

Para determinar si una fibra PAS positiva está compuesta de glucógeno, se trató con un preparado control con la enzima α -amilasa, que escinde el glucógeno específicamente, antes de realizar la tinción de PAS, también se utilizó para visualizar capilares periféricos de las fibras musculares.

TÉCNICA DE ATPASA MIOSÍNICA CON PREINCUBACIÓN ALCALINA (MODIFICADO POR LATORRE 1993)

1.- Preincubar durante 15 minutos en la solución:

Cl ₂ Ca	0.1 M
Acetato de sodio	0.07 M
Barbital sódico	0.075 M

pH: 10.2,10.3,10.4,10.5,10.6 (ajustados con NaOH 1M y 0.1 M)

2.- Lavar con agua destilada durante 5 minutos.

3.- Incubar durante 30 minutos en la solución:

Cl ₂ Ca	0.1 M
Acetato de sodio	0.07 M
Barbital sódico	0.075 M
ATP	1.5 mg/ml

pH: 9.45 (ajustado con NaOH 1M y 0.1 M)

4.- Lavar con cloruro de calcio 0.2 M: 2 de 5 minutos

5.- Lavar con cloruro de cobalto al 2 % durante 5 minutos

6.- Lavar con agua destilada: 2 baños

7.- Lavar con sulfuro de amonio al 1% durante 1 minuto

8.- Lavar con agua destilada de 2- 5 minutos

9.- Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes, aclarar con xilol y montar en medio sintético

TÉCNICA DE ATPASA MIOSÍNICA CON PREINCUBACIÓN ÁCIDA

En esta técnica la concentración del acetato sódico es muy baja y a la solución preincubadora se incorpora cloruro sódico.

1.- Preincubar en solución:

50 ml de solución A
101.5 ml de solución B
20 ml de cloruro sódico (8.5%)
Completar con agua destilada hasta 250 ml

Solución A:	Acetato de sodio (Pm 136.08)	1.94 gr
	Barbital sódico (Pm 206.18)	2.94 gr
	Agua destilada	100 ml
Solución B	CIH	0.1 N
	pH: 4.3, 4.5 y 4.6 (ajustados con NaOH 0.1M)	
	Tiempo de preincubación: 5 minutos	

2.- Lavar en la siguiente solución:

Barbital sódico	0.1 M (2 ml)
Cloruro de Calcio	0.18 M (1 ml)
Agua destilada	7 ml
pH: 9.4 (ajustar con CIH 0.1 N)	
Tiempo de lavado: 30 segundos	

3.- Incubar en la siguiente solución:

Solución de lavado con 15 mg de ATP
pH: 9.4 (ajustar con NaOH 1 M y 0.1 M)
Tiempo de incubación: 45 minutos

4.- Lavar con cloruro de calcio al 1%: 2 baños de 5 minutos

5.-Lavar con cloruro de cobalto al 2% durante 5 minutos

6.-Lavar con Barbital sódico 0.01 M de 5-10 minutos

7.- Lavar con agua destilada durante 30 segundos

8.- Lavar con sulfuro de amonio al 1% durante 1 minuto

9.- Lavar con agua destilada de 2-5 minutos

10.- Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes, aclarar con isoparafina y montar en medio sintético