

03097  
4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



**EFFECTOS DE LA DESNUTRICIÓN Y MALNUTRICIÓN  
SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRÁCTIL DEL MÚSCULO  
ESQUELÉTICO Y EL POTENCIAL DE ACCIÓN  
COMPUESTO DE NERVIOS CUTÁNEOS EN LA RATA EN  
DESARROLLO**

Trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias que presenta:

M. en C. Bertha Segura Alegria.

TUTOR

Dr. León Federico Cintra McGlone

COTUTOR

Dr. Ismael Jiménez Estrada

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

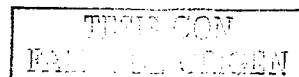
**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**

**A Ismael, por su apoyo y amor constantes. Por estar siempre a mi lado.**

**A Minerva, Selene y Juan Luis, por comprender mi trabajo.**

**A mis padres.**



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recensional.  
NOMBRE: Bertha Segura Alegria  
FECHA: 23-05-03  
FIRMA: [Firma]

## AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, por las facilidades brindadas durante la realización de este trabajo.

En especial al Dr. Ismael Jiménez Estrada, por su excelente asesoría y por su gran paciencia.

Al Dr. León Federico Cintra McGlone, por la acertada dirección de la presente tesis.

A los Dres. Manuel Salas Alvarado, Margarita Martínez Gómez, Marte Lorenzana Jiménez, Pablo Pacheco Cabrera y José Ramón Eguibar, por la cuidadosa revisión del manuscrito y por sus valiosas sugerencias.

Durante la realización del presente trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través del donativo 26342 otorgado al Dr. Ismael Jiménez Estrada y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, a través del donativo IN-208597 otorgado al Dr. León F. Cintra McGlone.

Así mismo, deseo agradecer a las autoridades de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, por haberme autorizado un año sabático en el periodo comprendido entre el 1 de septiembre del 2000 y el 31 de agosto del 2001.

Especialmente agradezco al Dr. Ignacio Peñalosa Castro el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.

También deseo hacer patente mi agradecimiento a los Biols. Ana Lilia Gutiérrez Lozano, Griselda Pratz Turbín y Mario Martínez Pantoja, así como el M. en C. Javier Pereyra Venegas, por su valiosa colaboración en la realización de algunos de los experimentos que constituyen esta tesis.

A los M. en C. Enrique Velázquez y Porfirio Reyes, por la elaboración de los programas utilizados para el análisis de datos.

A José Carlos Guadarrama Olmos, por el valioso apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	vi
PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS	x
ABSTRACT	xi
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
HIPÓTESIS	3
PROPÓSITO GENERAL DEL ESTUDIO	3

### PRIMERA PARTE:

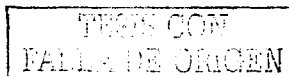
"Efecto de la desnutrición o la malnutrición perinatal sobre el desarrollo postnatal de las respuestas contráctiles de músculos rápidos o lentos de la rata".

INTRODUCCIÓN	5
Inervación	7
Tipos de unidades motoras	9
Fibras musculares de contracción lenta (Tipo I).	10
Fibras musculares de contracción rápida fatigables (Tipo IIB).	10
Fibras musculares de contracción rápida. resistentes a la fatiga (tipo IIA o IIX).	11
Ontogenia del músculo esquelético.	12
ANTECEDENTES.	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19

<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>19</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
Método de desnutrición y malnutrición:	21
Procedimientos quirúrgicos.	23
Estimulación y registro:	24
Análisis de datos:	25
<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
Peso corporal y muscular.	27
Tensión desarrollada durante la sacudida simple.	30
Tensión desarrollada durante la respuesta contráctil tetánica.	33
Relación sacudida simple-tétano.	36
Curso temporal de la sacudida simple.	37
Frecuencia de fusión.	39
Fatigabilidad.	41
Tensión pasiva y tensión activa.	44
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>63</b>

#### **SEGUNDA PARTE:**

"Efecto de la desnutrición o la malnutrición perinatal sobre la generación y transmisión del potencial de acción compuesto generados en nervios sensoriales periféricos, durante el desarrollo postnatal de la rata".



<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>65</b>
<b>Características morfológicas y electrofisiológicas de los nervios periféricos.</b>	<b>65</b>
<b>Clasificación de los axones en un nervio periférico</b>	<b>65</b>
Fibras del grupo A $\alpha$ .	66
Fibras del grupo A $\beta$ .	67
Fibras del grupo A $\delta$ .	67
Fibras del grupo C.	67
<b>Propiedades electrofisiológicas de los axones nerviosos periféricos.</b>	<b>67</b>
Umbral eléctrico de activación.	68
Velocidad de conducción.	68
Período refractario.	69
Cronaxia y reobase.	69
<b>Actividad eléctrica de los nervios periféricos.</b>	<b>72</b>
<b>Desarrollo ontogénico de los nervios periféricos.</b>	<b>73</b>
<b>Desarrollo del axón: Características generales</b>	<b>73</b>
<b>Mielina: generalidades y ontogenia.</b>	<b>75</b>
<b>ANTECEDENTES.</b>	<b>77</b>
<b>HIPÓTESIS.</b>	<b>79</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>80</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.</b>	<b>80</b>

<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>81</b>
Método de desnutrición y malnutrición.	81
Registro del potencial de acción compuesto.	81
Procesamiento de datos.	85
Histología.	85
Análisis estadístico .	86
<b>RESULTADOS</b>	<b>87</b>
Efecto de la desnutrición o malnutrición perinatales sobre el peso corporal.	87
Efecto de la desnutrición o malnutrición perinatal sobre el Potencial de Acción Compuesto (PAC).	87
Amplitud y área del PAC.	89
Umbral eléctrico de activación.	94
Período refractario absoluto.	98
Velocidad de conducción del impulso nervioso.	99
Análisis histológico.	101
<b>DISCUSION.</b>	<b>106</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>111</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>112</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>113</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>116</b>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS**

Los resultados obtenidos en la presente tesis han sido utilizados en la elaboración de los siguientes reportes de investigación (se incluyen copias de los reportes publicados al final del presente trabajo).

### **Artículos originales**

Segura, B., Guadarrama, J.C., Gutiérrez, A.L., Merchant, H., Cintra, L. And Jiménez, I.: Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutritional Neuroscience* 4(6): 475-488 (2001).

Segura, B., Guadarrama, J.C., Pratz, G., Mercado, V., Merchant, H., Cintra, L. And Jiménez, I. Functional and morphological alterations produced by perinatal undernutrition on sensory nerves of developing rats. En preparación (2003)

Segura, B., Martínez, M., Pereyra, J., Guadarrama, J., Cintra, L. And Jiménez, I.: Effect of perinatal food deprivation on contractile properties of fast and slow muscles in developing rats. En preparación (2003).

### **Capítulos en libros**

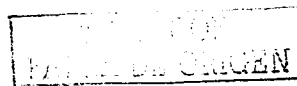
Segura, B. y Jiménez, I.: "Desarrollo ontogenético de las propiedades funcionales de músculos esqueléticos y de nervios periféricos". En: Martínez-Gómez, M. y Velázquez-Moctezuma, J. (Coords.): "Bases neurobiológicas y ecológicas de la conducta". Pp. 165-189. Ed. UAP, UAM, UV. UNAM. México (1998).

Asimismo de los resultados experimentales surgidos del presente estudio se han realizado 14 presentaciones en cartel u orales en congresos nacionales y 6 presentaciones en reuniones científicas internacionales (no incluidas).

## ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the possible alterations produced by restricted perinatal food intake, in quantity (undernutrition) or quality (malnutrition) on contractile activity of skeletal muscles and electrical responses of peripheral nerves. Because both types of studies have their own background and recording methodology this work was divided in two parts:

**A) Effects of undernutrition and malnutrition on the contractile properties of fast- and slow-muscles.** Isometric twitch and tetanic responses evoked by single (0.1 Hz) or trains of pulses (5 to 100 Hz) of supramaximal intensity were recorded. The stimuli were delivery through silver electrodes located in the surface of extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL) muscles from anesthetized control, undernourished (UNDN) and malnourished (MALN) rat pups at different postnatal days (PN15, PN25, PN35, PN60 and PN90). At 15, 25 and 35 post-natal days it was observed that twitch and tetanic responses of UNDN and MALN- EDL muscles showed greater peak-tension per cross sectional area (80-230%;  $p < 0.001$ ) and lower fatigability (25-35%; ANOVA one way;  $p < 0.001$ ) than the responses evoked in control EDL muscles. However, at PN60 and PN90 both control and food-deprived EDL muscles developed similar normalized tension and fatigue responses. In contrast, control and food-deprived SOL muscles showed no significant changes in fatigue and tension development at all postnatal ages. Our results would suggest that perinatal undernourishment and malnourishment exerts a very selective effect on fast contracting muscle fibers. Such effect is probably



exerted on the contractile protein concentration and/or the muscle fiber transformation from not-fatigable type IIA (oxidative-glycolitic) or type IIX (glycolitic-oxidative) to adult type IIB (glycolitic) muscle fibers during the early postnatal developmental of the rat.

**B) Effects of undernutrition and malnutrition on generation and propagation of the compound action potential (CAP) evoked in sensory sural nerves during the postnatal development of the rat.** Compound action potentials were recorded in sural nerves of control, UNDN or MALN at different post-natal ages (PN8, PN12, PN16, PN25, PN30, PN60 and PN90). Low intensity stimulation (2-3 times the threshold of the most excitable nerve fibers) applied to the sural nerve could evoke an early potential (CAP-A component) which is due to activation of low-threshold, fast conducting myelinated group A afferent fibers. A higher stimulus intensity (20-30 xT) produced a second, long-lasting potential (CAP-C component) probably due to activation of high-threshold, slow-conducting A $\delta$  or C fibers. The CAP-A component, but not CAP-C component of undernourished and malnourished nerves showed significant changes in amplitude, area, electrical threshold and conduction velocity at several post-natal ages comparatively with control nerves. Histological analysis of an additional set of sural nerves with 30 and 90 post-natal days indicates that control and undernourished sural nerves contain a similar number. Meanwhile a significant reduction was observed in the whole transversal section and the axonal myelin sheath thickness of experimental nerves in regard to control nerves. The diameter of undernourished axons, at 90 but not at 30 postnatal days, was significantly lower than axons of control sural nerves. Our



results may suggest that a relative large number of myelinated group A afferent fibers in the sural nerve of undernourished and malnourished animals suffer severe alterations on their electrophysiological properties for generation and propagation of the action potential during the post-natal development of the rat.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



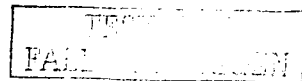
## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar las posibles alteraciones que provoca una alimentación perinatal deficiente en cantidad (desnutrición) o en calidad (malnutrición) sobre la respuesta contráctil del músculo esquelético rápido y lento y sobre la generación y propagación del potencial de acción compuesto (PAC) registrado en el nervio sural, de la rata en desarrollo. Debido a que se efectuaron registros mecánico y eléctrico y a que cada uno de ellos conlleva una estructura conceptual y metodológica particular el trabajo fue dividido en dos partes.

**A) Efectos de la desnutrición y malnutrición sobre las propiedades contráctiles sobre los músculos rápidos y lentos.** Los músculos extensor digitorum longus (EDL) y sóleo (SOL), de ratas controles, desnutridas y malnutridas de diferentes edades postnatales (15, 25, 35, 60 y 90 días), fueron estimulados mediante pulsos únicos (0.1 Hz) o series de pulsos de intensidad supramáxima y frecuencia creciente (desde 5 hasta 100 Hz). Nuestros resultados muestran que en respuesta a la estimulación con un solo pulso el músculo EDL de los animales desnutridos y malnutridos con 15, 25 y 35 días de edad, desarrolló mayor fuerza por área de sección transversal (80-230%;  $p < 0.001$ ) y menor fatigabilidad (25-35%; ANOVA simple:  $p < 0.001$ ), que el mismo músculo de animales control. Sin embargo a los 60 y 90 días de edad postnatal, tanto la fuerza normalizada como el índice de fatigabilidad presentaron valores semejantes para el músculo EDL de ratas control, desnutridas y malnutridas. Así mismo, el músculo

SOL de animales control, desnutridos y malnutridos, de todas las edades analizadas, no presentó alteraciones significativas en los parámetros evaluados. Estos resultados sugieren que la desnutrición y malnutrición perinatales afectan selectivamente a las fibras musculares de sacudida rápida, probablemente por un incremento en la densidad de proteínas contráctiles por área de sección transversal o bien a un retraso en la transformación de las fibras musculares de rápidas no fatigables del tipo IIA (oxidativas-glucolíticas) o del tipo IIX (glucolíticas-oxidativas) a fibras del tipo IIB (glucolíticas), en las ratas sometidas perinatalmente a desnutrición o malnutrición.

**B) Efectos de la desnutrición y malnutrición sobre la generación y propagación del potencial de acción compuesto provocado en el nervio sural de la rata en desarrollo.** El registro del potencial de acción compuesto (PAC) se efectuó sobre el nervio sural aislado de ratas controles, desnutridas y malnutridas de diferentes edades postnatales (8, 12, 16, 25, 30, 60 y 90 días). Para ello se utilizó un par de electrodos de succión (estimulación y registro respectivamente). Se aplicaron pulsos únicos de corriente de baja intensidad (2-3 veces umbral; xU) que provocaron la aparición del componente temprano del PAC (componente A), generado por la excitación de los axones mielínicos de bajo umbral y velocidad alta de conducción en el nervio. Posteriormente, pulsos de corriente de mayor intensidad (20-30 xT) fueron aplicados al nervio para excitar los axones amielínicos de alto umbral y baja velocidad de conducción y que generan el componente C del PAC. Los nervios de ratas desnutridas y malnutridas de todas las edades registradas, muestran una disminución en la amplitud y el área, así como en la velocidad de conducción del componente A del PAC, además de un



incremento en el umbral de activación de las fibras mielínicas más excitables, con respecto a los nervios de las ratas control. En contraste el componente C del PAC presentó características semejantes en el nervio sural de ratas control, desnutridas y malnutridas, de todas las edades estudiadas. El análisis histológico mostró que el número de axones contenidos en el nervio sural de animales control y desnutridos, es similar a los 30 y 90 días de edad postnatal. Sin embargo, en los nervios de animales desnutridos se redujo el diámetro total del nervio y el grosor de la vaina de mielina que rodea a los axones. También se observó una disminución en el diámetro de los axones de los nervios de animales desnutridos de 90 días, pero no en los de 30 días de edad postnatal. Estos resultados sugieren que la desnutrición y la malnutrición perinatales provocan severas alteraciones en la generación y propagación del potencial de acción en las fibras aferentes mielinizadas de la rata en desarrollo.

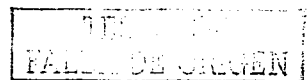
## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

Para conservar la integridad anatómica y funcional de los organismos es indispensable que éstos reciban un aporte de nutrimentos adecuado y suficiente. Cada nutrimento desempeña un papel de gran importancia para el desarrollo de los animales, incluido el ser humano. Por ejemplo, el metabolismo de las proteínas proporciona a los organismos un aporte apropiado de aminoácidos, los cuales son esenciales para el crecimiento, el mantenimiento de la estructura celular y la construcción y/o reparación de los distintos sistemas enzimáticos (Winick, 1979). Las grasas, además de ser compuestos esencialmente energéticos, contribuyen de manera importante en el mantenimiento del almacén de glucógeno en el hígado y participan en la formación de algunas hormonas y vitaminas (Hahn, 1979). Estructuralmente, las grasas están presentes como fosfolípidos en las membranas celulares y en el citoplasma (Lehninger y cols., 1970).

Por su parte, los carbohidratos tienen como función principal el proporcionar energía al organismo, aunque también participan en la formación de algunas enzimas y de proteínas conjugadas presentes en el cartílago (Hahn, 1979, Winick, 1979).

La proporción requerida de cada uno de estos nutrimentos varía en función de la edad y de la especie del animal. Así, por ejemplo la rata requiere durante su desarrollo embrionario de una mayor cantidad de carbohidratos que de grasas, pero esta relación se invierte durante la lactancia. En cambio, la ingestión de proteínas es importante en ambas etapas del desarrollo (Hahn, 1979).

En el caso de que un organismo reciba un aporte insuficiente en cantidad y/o calidad (de alguno o de todos los compuestos anteriormente señalados)



durante su desarrollo embrionario y/o de lactancia, presentará alteraciones anatómicas, funcionales y conductuales de consideración durante toda su vida (Waterlow y Stephen, 1969; Goldspink y Ward, 1979; Howart, 1972; Lopes y cols., 1982; Russell y cols., 1984a,b; Morgane y cols., 1978, 1993).

A cualquier forma de alimentación deficiente se le llama **malnutrición**, bajo este concepto se incluyen tanto la deficiencia selectiva de un solo nutriente, como la disminución de dos o más de los nutrientes, necesarios para el buen funcionamiento del organismo. Por otra parte, la deficiencia en el aporte de nutrientes mediante una disminución en la cantidad total de calorías proporcionadas al organismo se le denomina **desnutrición** (Morgane y cols., 1978).

Se ha considerado a la desnutrición y/o malnutrición como uno de los problemas de salud pública de alta prioridad (ver Blakburn, 2001). La comprensión, prevención, diagnóstico y tratamiento de esta patología, que hoy en día sufren más de mil millones de personas en el mundo (Blakburn, 2001), dependen en gran medida del futuro desarrollo de nuevas tecnologías que permitan incrementar tanto la producción como la calidad de los alimentos. De igual manera, es imprescindible contar con líneas de investigación que permitan establecer con claridad los mecanismos o procesos fundamentales de los organismos que se vean afectados por este padecimiento así como para establecer los procedimientos clínicos o alimentarios que se requieran desarrollar para mitigar o abatir los efectos de la desnutrición.

Por lo anterior, se ha puesto un considerable interés en los posibles efectos que desencadena la reducción de la ingesta sobre diversos tejidos y órganos,

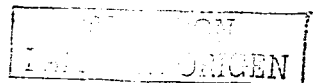
entre los que destacan el sistema nervioso y el sistema muscular de los organismos (vease Morgane y cols., 1993). Sin embargo y a pesar de que en la literatura especializada existen numerosas evidencias experimentales, de carácter morfológico, fisiológico, bioquímico y/o conductual, acerca de los posibles efectos que produce la desnutrición sobre el Sistema Nervioso Central y sobre los músculos esqueléticos (ver: Morgane y cols., 1978, 1993; Goldspink, 1996), en la actualidad existe una notoria falta de información sobre las posibles alteraciones que desencadena una deficiencia alimentaria peri-natal, en cantidad y/o calidad, sobre el desarrollo postnatal de las propiedades fisiológicas de los músculos esqueléticos y de los nervios periféricos en los animales.

## **HIPÓTESIS**

La deficiencia en el aporte de nutrimentos (desnutrición o malnutrición) durante las etapas de gestación y lactancia, provocará alteraciones en el patrón de contracción del músculo esquelético y en la generación y conducción del potencial de acción compuesto de nervios periféricos durante el desarrollo postnatal de la rata.

## **PROPÓSITO GENERAL DEL ESTUDIO**

El propósito general del presente estudio es determinar las posibles alteraciones que producen la malnutrición proteínica (dieta isocalórica, con una reducción selectiva de proteínas en el alimento) o la desnutrición (dieta hipocalórica, lograda mediante la reducción de la ingesta) peri-natal sobre las



propiedades contráctiles de los músculos de las extremidades posteriores y sobre la generación y transmisión del potencial de acción compuesto en nervios sensoriales periféricos, durante el desarrollo postnatal de la rata.

Para cumplir con este propósito, se realizaron dos tipos de observaciones experimentales, las que por sí mismas, conllevan objetivos particulares independientes. Por lo anterior el presente estudio se ha dividido en dos partes, la primera hace referencia al efecto de la alimentación peri-natal deficiente sobre el desarrollo postnatal de la actividad contráctil de músculos esqueléticos, que en el animal adulto poseen características contráctiles de sacudida rápida, tales como el músculo extensor digitorum longus (EDL) o de contracción lenta, como el músculo sóleo (SOL). En la segunda parte, se analizan los efectos de la desnutrición o malnutrición peri-natales sobre el desarrollo postnatal de las propiedades electrofisiológicas del nervio sural (SU), el cual predominantemente contiene fibras nerviosas provenientes de receptores sensoriales localizados en la piel de las extremidades posteriores de la rata.

## PRIMERA PARTE

### **"EFECTO DE LA DESNUTRICIÓN O LA MALNUTRICIÓN PERINATAL SOBRE EL DESARROLLO POSTNATAL DE LAS RESPUESTAS CONTRÁCTILES DE MÚSCULOS RÁPIDOS O LENTOS DE LA RATA".**

#### INTRODUCCIÓN

La respuesta mecánica del músculo a un estímulo, ya sea aplicado directamente sobre éste o a través de su nervio, se denomina **contracción o sacudida simple** y puede estudiarse experimentalmente en preparaciones neuromusculares o en músculos aislados (Para una revisión detallada de los procesos metabólicos, moleculares y/o estructurales intrínsecos a la contracción muscular se recomienda la lectura de los capítulos correspondientes de los siguientes libros: Davson, 1970; Aidley, 1989; Keynes y Aidley, 1985; Kandel, Schwartz y Jessell, 1997; Cingolani y Housay, 2000).

Durante una sacudida simple, el músculo desarrolla tensión o efectúa trabajo, por lo que se han descrito dos tipos de contracciones musculares: la isotónica (Fig. 1A) y la isométrica (Fig. 1B; Aidley, 1989). La **contracción isotónica** es aquella en la que el músculo cambia su longitud, pero no desarrolla tensión. Este tipo de contracción es efectuada por aquellos músculos cuya función es producir movimiento en las articulaciones. En cambio, en una **contracción isométrica** el músculo desarrolla tensión sin cambiar de longitud. Este tipo de contracción ocurre predominantemente en los músculos posturales, los cuales requieren desarrollar fuerza o mantener una posición corporal constante.





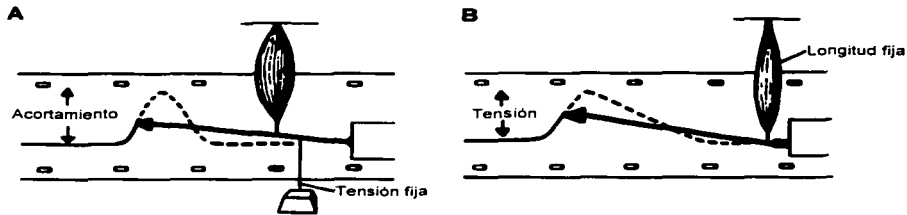


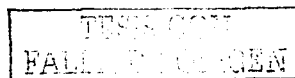
Figura 1.- Tipos de sacudidas simples de los músculos esqueléticos. Contracción isotónica (A) y contracción isométrica (B).

Una sacudida simple isométrica muestra una fase rápida de incremento en la tensión, seguida de una fase de relajación (caída de tensión) más lenta, tras la cual se restablece la tensión inicial (Fig. 2A). Comparativamente con el breve curso temporal de los potenciales de acción nervioso y muscular (entre 1 y 3 ms), el tiempo necesario para efectuar una sacudida muscular es muy grande (entre 10 y 100 ms, dependiendo del tipo de músculo). Esto se debe en parte, al tiempo que se necesita para recapturar al ión calcio hacia el interior del retículo sarcoplásmico. Esta característica de la sacudida muscular provoca que la

generación sucesiva de potenciales de acción activen de nueva cuenta a una fibra muscular antes de que ésta se relaje completamente (Fig. 2B). Bajo esta situación la fuerza producida por cada una de las sacudidas individuales se sumará, hasta que la fuerza desarrollada alcance una meseta. Esta forma de respuesta a la generación sucesiva de potenciales de acción o a la estimulación eléctrica repetitiva se denomina **tétanos** (Fig. 2C). Durante una sacudida tetánica, el músculo desarrolla su fuerza máxima, debido a que cada fibra muscular presenta el número máximo de puentes cruzados que las miofibrillas son capaces de formar (Keynes y Aidley, 1985; Davson, 1970).

### **INERVACIÓN**

A cada músculo esquelético entran una o dos ramas del nervio que los inerva, en estas se incluyen las fibras nerviosas aferentes que inervan los husos musculares (sensibles a cambios en la longitud muscular) y las del órgano tendinoso de Golgi (sensibles a cambios en la tensión del músculo), así como varias terminaciones nerviosas libres, algunas de las cuales se encuentran relacionadas con sensaciones dolorosas (Fig. 3). En los mamíferos, la inervación motora está representada por fibras nerviosas provenientes de las motoneuronas gamma, que inervan a las fibras musculares intrafusales y por fibras que se originan en las motoneuronas alfa e inervan a las fibras musculares extrafusales (ver: Kandel y cols. 1997). Cada fibra muscular es inervada por solo una moto-



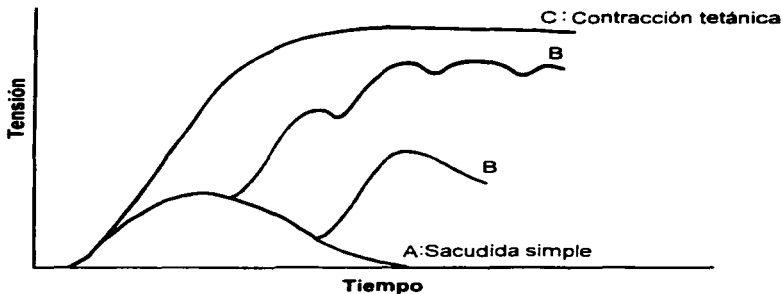


Figura 2. Tensión desarrollada por el músculo esquelético, en respuesta a la estimulación con un pulso único (sacudida simple, A) o a la estimulación repetitiva (fenómeno de la escalera, B y B' o contracción tetánica, C).

neurona, pero cada moto-neurona puede inervar a numerosas fibras musculares esqueléticas. Todas las fibras musculares inervadas por una moto-neurona se contraen en respuesta a la activación (potencial de acción) del axón motor. El conjunto de fibras musculares y el axón motor que las inerva constituyen la unidad funcional del sistema motor, el cual se denomina **unidad motora** (Liddell y Sherrington, 1925). Cabe señalar que existen dos tipos de unidades motoras: a) aquellas formadas por moto-neuronas que tienen una frecuencia de disparo relativamente pequeña e inervan a fibras musculares rojas o de contracción lenta y b) las constituidas por moto-neuronas que disparan con frecuencia alta e inervan fibras musculares denominadas blancas o de contracción rápida (Burke y cols., 1974).

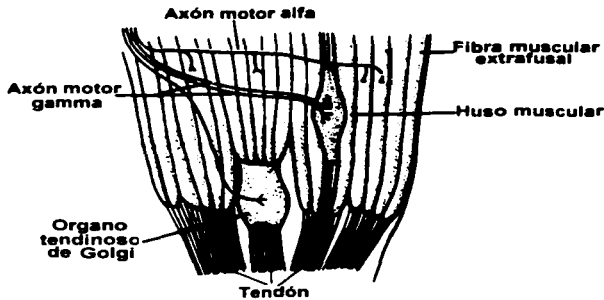


Figura 3.- Inervación sensitiva: huso muscular (sensible a cambios en la longitud) y órgano tendinoso de Golgi (que detecta cambios en la tensión) y motora: axones motores  $\alpha$  (inervan fibras extrafusales) y axones motores  $\gamma$  (inervan fibras intrafusales), del músculo esquelético (Tomado de Kandel y cols. 1997)

### TIPOS DE UNIDADES MOTORAS

A simple vista es posible distinguir un músculo blanco de uno rojo, debido al color pálido del primero, pero las diferencias entre ambos tipos musculares no se limitan a su aspecto externo, sino que también incluyen sus características contráctiles. Cuando un músculo blanco es estimulado con un pulso único éste responde con una sacudida simple de pequeña duración, mientras que un músculo rojo responde al estímulo con una sacudida de mayor duración (Fig. 4). Estas diferencias en los tiempos de contracción y relajación de la contracción son el reflejo de distintas características fisiológicas y bioquímicas de las fibras musculares presentes en las unidades motoras. En función de estas características, las fibras musculares de los mamíferos se han clasificado en:

**Fibras musculares de contracción lenta (Tipo I).** Estas fibras tienen un tiempo de contracción prolongado y generan escasa fuerza durante la sacudida simple. Sin embargo, la fuerza desarrollada por estas fibras no decae al ser estimuladas con trenes de pulsos (Fig. 4 A). La resistencia a la fatiga ha sido asociada a la presencia de un considerable número de mitocondrias y a una tasa muy baja en la utilización del ATP (Close, 1964; Goldspink, 1980; Kandel y cols., 1997). Básicamente, las fibras musculares de contracción lenta presentan un metabolismo oxidativo y cuentan con grandes cantidades de mioglobina, lo que le da su característico color rojizo. Por otra parte, utilizando anticuerpos específicos, Lutz y cols. (1979) han demostrado la existencia de una isoforma de miosina presente exclusivamente en estas fibras musculares, la miosina lenta.

**Fibras musculares de contracción rápida y fatigables (Tipo IIB).** Presentan un tiempo de contracción relativamente breve, lo cual se ha asociado con la presencia en su interior de concentraciones altas de miosina ATP-asa y de fosforilasa. Su metabolismo es glucolítico y generan una gran fuerza durante su contracción (hasta 100 veces más que la generada por las fibras de sacudida lenta), pero se fatigan rápidamente al ser estimuladas con trenes de pulsos (Fig. 4 C). Estas fibras musculares contienen una isoforma rápida de la miosina, debido a que reaccionan con el anticuerpo específico a esa isoforma (Fiorotto y cols., 2000).

Cabe señalar que aquellos músculos formados predominantemente por fibras de sacudida lenta se relacionan con el mantenimiento de la postura del organismo y por tal motivo se les denomina músculos posturales, mientras que los músculos constituidos esencialmente por fibras de sacudida rápida son los



encargados de realizar el movimiento de las articulaciones, lo que permite que el animal se mueva o se desplace de un lugar a otro.

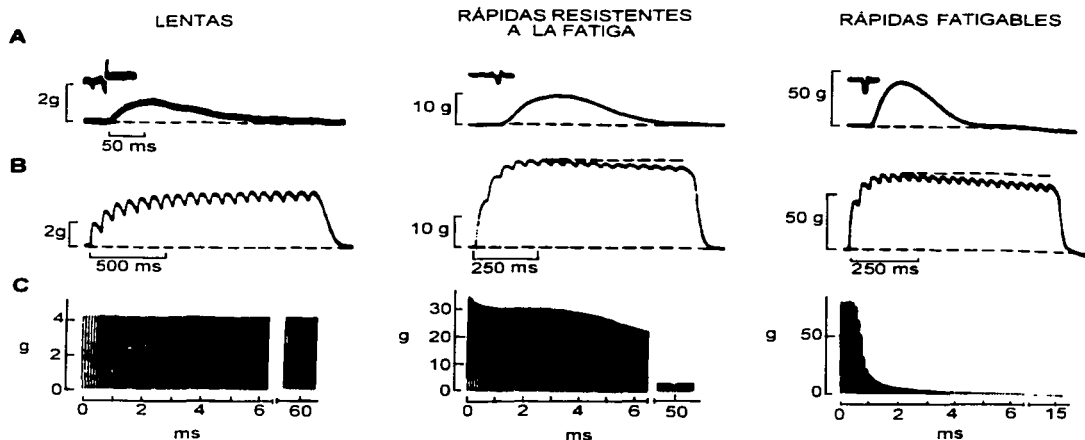


Figura 4.- Características contráctiles de las fibras musculares de sacudida lenta (A), rápidas resistentes a la fatiga (B) y rápidas fatigables (C) (Tomado de Kandel y cols. 1997).

**Fibras musculares de contracción rápida, resistentes a la fatiga (tipo IIA o IIX).**- Estas fibras presentan características contráctiles intermedias entre las fibras rápidas y las lentas: la duración de su sacudida es ligeramente mayor que la de las fibras rápidas fatigables y presentan una resistencia a la fatiga semejante a la de las fibras lentas (Fig. 4B). Durante la estimulación repetitiva, estas fibras musculares desarrollan más fuerza que las fibras rápidas y que las fibras lentas (Burke y cols., 1974). Este tipo de fibras reaccionan principalmente con el anticuerpo específico para la miosina rápida pero también reaccionan, aunque en menor proporción, con el anticuerpo específico para la miosina lenta. También

presentan un metabolismo dual, oxidativo y glucolítico y dependiendo de la preponderancia de un tipo de metabolismo con respecto al otro, se les conocen como fibras oxidativas-glucolíticas o **tipo IIA** o bien, como fibras glucolíticas-oxidativas o **tipo IIX** (Fiorotto y cols., 2000).

### **ONTOGENIA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO.**

El músculo esquelético tiene su origen embriológico en el mesodermo somático, que en las primeras fases de desarrollo se segmenta transversalmente desde la región cefálica a la caudal, formando numerosas somitas. Cada somita está formada por células epiteliales y a partir de éstas se forman el *esclerotomo* que dará origen a las vértebras, el *dermatomo* que formará la dermis y el *miotomo* del cual se originarán los músculos. Las células del miotomo sintetizan miosina y se transforman en mioblastos, los cuales empiezan a formar paquetes organizados de filamentos contráctiles, llamados miotubos (Goldspink, 1980; Buckingham, 1994).

El primordio de los músculos esqueléticos de la rata contiene fascículos de dos a seis miotubos, cuyas sarcolemas se encuentran conectadas entre sí mediante uniones comunicantes. Durante la histogénesis, los músculos presentan dos generaciones de miotubos: la primera se hace evidente a partir del día 15 de gestación; tales miotubos poseen una miosina (embrionaria) que presenta características inmuno-histoquímicas semejantes a las de la miosina rápida. A partir del día 17 de gestación, la miosina presente en los miotubos de la primera generación cambia gradualmente sus características inmuno-histoquímicas hacia las de la miosina lenta; al mismo tiempo, rodeando a los miotubos primarios, surge

la segunda generación de miotubos. Los miotubos secundarios o de la segunda generación mantienen una estrecha relación con los miotubos primarios (Rubinstein y Kelly, 1981).

Los miotubos de la primera y de la segunda generación presentan un núcleo central, una gran acumulación de glucógeno en el centro y miofibrillas periféricas. Estos complejos celulares están rodeados por una lámina basal, en la que se han observado dos formas de contacto neuromuscular, la primera consiste de una aposición estrecha entre el axón y la membrana plasmática del miotubo, mientras que la segunda es semejante a una placa motora primitiva, consistente de pequeños axones terminales que contienen vesículas opacas en su interior. Este tipo de unión se observa exclusivamente en los miotubos primarios (Rubinstein y Kelly, 1981).

En días previos al nacimiento (19 a 21 días de gestación en la rata), los miotubos de la primera generación presentan placas terminales bien diferenciadas, mientras que los miotubos de la segunda generación, ya separados de los miotubos primarios, presentan placas terminales primitivas (Rubinstein y Kelly, 1981). En esta etapa del desarrollo, un porcentaje alto de fibras musculares originadas supuestamente de la primera generación de miotubos, presentan una reacción inmuno-histoquímica semejante a la de las fibras lentas. Las fibras que surgen a partir de la segunda generación de miotubos también reaccionan con el anticuerpo específico para la miosina lenta. Cabe señalar que en esta etapa del desarrollo muscular se presentan miotubos que reaccionan tanto con el anticuerpo específico de las fibras lentas como con el de las rápidas, por lo cual se considera que existe un tipo de miosina de transición (Botinelli y cols., 1991).



En los días posteriores al nacimiento, la mayor parte de las fibras musculares reaccionan tanto con el anticuerpo específico para la miosina rápida como con el de la miosina lenta. En las primeras tres o cuatro semanas de vida postnatal ocurre la diferenciación de las fibras musculares, manifestándose gradualmente un solo tipo de reacción inmuno-histoquímica (miosina lenta o miosina rápida). La diferenciación de las fibras musculares en lentas y rápidas depende de la localización corporal y de la función que desempeña cada músculo en particular (Rubinstein y Kelly, 1981, Navarrete y Vrbová, 1993).

Desde el punto de vista mecánico también se han observado cambios en la actividad contráctil del músculo esquelético durante su desarrollo ontogénico. Close (1964), reporta que durante el período postnatal temprano todos los músculos de las extremidades posteriores de la rata, desarrollan contracciones con un curso temporal similar al de los músculos de sacudida lenta y que durante las primeras cuatro semanas de vida postnatal se lleva a cabo la diferenciación en músculos de sacudida rápida y lenta (Fig. 5.A). Este mismo autor observa que a medida que los animales crecen, sus músculos son capaces de desarrollar mayor tensión durante la sacudida simple (Fig.5 B) y de producir la sacudida tetánica con mayores frecuencias de estimulación.

También se ha reportado que los músculos en desarrollo sufren cambios metabólicos importantes, sobre todo en la actividad de las enzimas glucolíticas y oxidativas que proporcionan la energía necesaria para efectuar la contracción muscular. Nemeth y cols. (1989), han reportado que en los animales recién nacidos, la actividad de ambos grupos de enzimas es semejante en los músculos de sacudida lenta y en los de contracción rápida. Pero durante el primer mes de

vida postnatal los músculos de sacudida rápida incrementan considerablemente la actividad de las enzimas glucolíticas y reducen la de las enzimas oxidativas; mientras que en los músculos de sacudida lenta el incremento en la actividad de las enzimas oxidativas se prolonga hasta las seis semanas de vida postnatal.

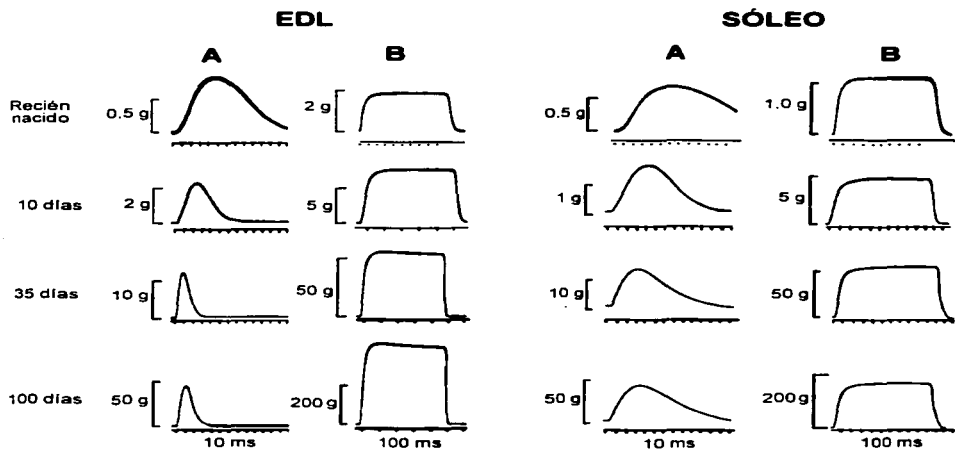


Figura 5. Los músculos de las extremidades posteriores de la rata recién nacida presentan una contracción isométrica semejante a la de los músculos de sacudida lenta del adulto, pero a medida que los animales crecen sus músculos adquieren los patrones de contracción típicos de los músculos de sacudida rápida o lenta. En A se ha representado la tensión desarrollada durante una sacudida simple y en B la tensión que desarrollan los músculos EDL y sóleo, de diferentes edades postnatales, durante una contracción tetánica. En las abscisas se representa el tiempo de la contracción (medida en ms) y en las ordenadas la tensión desarrollada (medida en gramos, g) durante la sacudida simple (A) o la contracción tetánica isométrica (B, modificado de Close, 1964).

Como puede observarse, existe una clara correlación entre los cambios registrados en las actividades contráctil y enzimática con las modificaciones morfológicas observadas mediante técnicas inmuno-histoquímicas. Esto significa que los músculos de los mamíferos altriciales presentan cambios postnatales tanto



en sus características contráctiles como en sus fuentes energéticas y su morfología (Close, 1964; Rubinstein y Kelly, 1981; Nemeth y cols., 1989), lo cual les permitirá adaptarse al medio ambiente en que viven. Ahora bien, esta serie de cambios que ocurren durante el desarrollo de los músculos esqueléticos, puede ser afectada por numerosos factores externos e internos entre los que destacan: la actividad muscular (ejercicio), los niveles de hormonas circulantes, las condiciones de alimentación del organismo, etc.

#### **ANTECEDENTES.**

Lo primero que se observa al alimentar animales experimentales con dietas hipocalóricas o con deficiencias proteínicas, es que éstos sufren una disminución en su peso corporal (entre el 40 y el 60%), con respecto a los animales alimentados con dietas balanceadas (Russell y cols., 1984b; Ihemelandu, 1985). Según Hegarty y Kim (1980), la disminución en el peso corporal podría asociarse con la disminución en el diámetro, la longitud y el número de fibras musculares de los animales alimentados con dietas deficientes.

Además de los cambios estructurales señalados, los músculos esqueléticos de animales sometidos a una dieta deficiente en cantidad (hipocalórica) o en calidad (generalmente hipo-proteínica), sufren alteraciones en sus características contráctiles. Así, Russell y cols. (1984b) reportan un incremento en los tiempos de contracción y de relajación, así como en la fuerza desarrollada por el músculo gastrocnemio de ratas adultas alimentadas con dietas hipo-proteínicas. Mediante el uso de técnicas histoquímicas, Russell y cols. (1984a y b); e Ihemelandu (1985) han observado que la alimentación deficiente (dieta hipocalórica) provoca mayores



alteraciones en los músculos de sacudida rápida que en los de sacudida lenta de los animales adultos. También se ha reportado que al re-alimentar a los animales adultos se revierten las alteraciones producidas por la desnutrición (Goldspink y Ward, 1979; Bedi y cols., 1982). Sin embargo, cuando la restricción del alimento ocurre durante los períodos de gestación y lactancia (período peri-natal), la disminución en el número, diámetro y longitud de las fibras musculares, así como en la proporción de fibras de sacudida rápida son irreversibles (Haltia y cols., 1978; Bedi y cols., 1982).

Poco se sabe acerca de las alteraciones que provoca una alimentación peri-natal deficiente, en cantidad (desnutrición) o calidad (malnutrición), sobre las propiedades funcionales del músculo esquelético. Wareham y cols. (1982), analizaron el patrón de contracción de los músculos EDL y SOL de ratas adultas, sometidas a desnutrición peri-natal, y encontraron que no existen cambios significativos en los tiempos de contracción y relajación de la sacudida simple, pero sorprendentemente ambos músculos (EDL y SOL) desarrollaron mayor fuerza por gramo de tejido húmedo que los mismos músculos pero de animales control. Por otra parte, en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, en el que se utilizó el músculo gastrocnemio (músculo mixto) de ratas jóvenes (entre 21 y 27 días postnatales), sometidas a desnutrición neonatal mediante el hacinamiento de crías, se observaron incrementos tanto en los tiempos de contracción y de relajación de la sacudida simple como en la fuerza por gramo de tejido húmedo de los animales sometidos a desnutrición; además se encontró un aumento significativo en la actividad de la enzima creatina-cinasa (CK). El incremento en los tiempos de contracción y relajación se asoció con una mayor

proporción de fibras de sacudida lenta en el músculo, en tanto que el incremento de fuerza por gramo de tejido y el aumento de la actividad enzimática observados en los músculos de los animales desnutridos, se explicó al suponer que en los músculos de las ratas desnutridas podría existir un porcentaje relativamente alto de fibras musculares en proceso de transformación y que posiblemente éstas utilizaban el metabolismo aerobio (oxidativo) como principal fuente de energía para su contracción (Segura, 1993).

Como puede observarse, la información disponible en la actualidad acerca de las alteraciones causadas por la desnutrición y la malnutrición sobre las características contráctiles de los músculos esqueléticos es escasa y fragmentada, ya que la mayor parte de los autores realizaron sus estudios utilizando técnicas inmunohistoquímicas para comparar los músculos de animales sometidos a dietas restringidas con los de animales control y los pocos investigadores que evaluaron la actividad contráctil del músculo esquelético realizaron sus experimentos en animales adultos sometidos a desnutrición o malnutrición únicamente durante los periodos de gestación y/o lactancia. Por lo anterior resulta de particular interés el analizar y comparar las posibles alteraciones causadas por las dietas hipocalóricas (desnutrición) e hipo-proteínicas (malnutrición) peri-natales, sobre las características contráctiles de los diferentes tipos musculares (rápidos, lentos y mixtos) durante el desarrollo postnatal de los animales.

## **HIPÓTESIS**

La alimentación deficiente en calidad (malnutrición proteínica) o en cantidad (50% de alimento) provocará alteraciones en el desarrollo del patrón de contracción mecánica de los músculos de sacudida rápida y de sacudida lenta de la rata.

Para probar esta hipótesis, en esta primera sección del presente estudio se han planteado como objetivos experimentales, los siguientes:

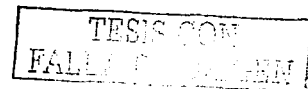
### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar los efectos que producen la desnutrición o la malnutrición proteínica, sobre el desarrollo postnatal de las propiedades contráctiles de músculos rápidos y lentos de las extremidades posteriores de la rata.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

**A.** Determinar las alteraciones que producen la desnutrición (50% de alimento) o la malnutrición proteínica (caseína 6%) sobre la contracción isométrica simple de los músculos extensor digitorum longus (EDL) y sóleo (SOL) de ratas con distintas edades postnatales.

**B.** Establecer las modificaciones provocadas por la desnutrición (50% de alimento) y la malnutrición proteínica (caseína 6%) sobre la respuesta contráctil generada por diferentes frecuencias de estimulación en los músculos EDL y SOL de ratas con distintas edades postnatales.



**C. Caracterizar el efecto de la desnutrición (50% de alimento) y la malnutrición proteínica (casína 6%) sobre la fatigabilidad de la respuesta contráctil de los músculos EDL y SOL, durante el desarrollo postnatal de la rata.**

**D. Establecer si la alimentación deficiente en cantidad (desnutrición) ejerce un efecto diferencial, con respecto a la alimentación deficiente en calidad (malnutrición proteínica), sobre las características contráctiles de los músculos rápidos y lentos en desarrollo.**

## MATERIAL Y MÉTODOS

La fase experimental de la presente tesis se efectuó en el Laboratorio 11 (Edificio de Fisiología 1) del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN, a cargo del Dr. Ismael Jiménez Estrada.

### **Método de desnutrición y malnutrición:**

Los experimentos correspondientes a esta sección del presente estudio fueron realizados en crías (machos) de la rata, variedad Wistar. Los animales fueron obtenidos al colocar a tres grupos de ratas hembra, con un peso inicial de 250 g, bajo diferentes regimenes de alimentación, desde tres semanas previas al apareamiento y durante el período peri-natal (tabla 1):

- a) **Grupo de animales control.** Este grupo de ratas y sus crías tuvieron libre acceso al agua y al alimento (Formulab 5008, LabDiet) durante toda la fase experimental.
- b) **Grupo de animales desnutridos.** Desde tres semanas previas al apareamiento y durante los períodos de gestación y lactancia se alimentó a un grupo de ratas y sus crías con el 50% de la cantidad de alimento que, en promedio, ingerían las ratas hembras control (Chow y Lee, 1964; Bedi, 1994); y
- c) **Grupo de animales malnutridos.** Al igual que el grupo de animales desnutridos, desde tres semanas antes del apareamiento y durante la gestación y la lactancia a este grupo de ratas y sus crías se les proporcionó una dieta baja en proteínas (caseína 6%; Morgane y cols., 1978).

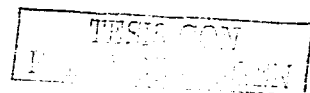


Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las normas éticas señaladas en la guía de los Institutos Nacionales de Salud (NIH Publications No. 8023), para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

A todos los animales se les proporcionó agua *ad libitum*. En el día del parto (día cero post-natal), se ajustó a ocho el número de crías por camada y desde ese entonces, en forma periódica se les determinó el peso corporal a cada una de las crías, hasta el día en que se realizó el experimento agudo (registro de la actividad contráctil del músculo esquelético o del potencial de acción compuesto en el nervio sural; ver más adelante). Es importante señalar que debido a factores fuera de nuestro control, no fue posible mantener la dieta hipoproteínica más allá de los 35 días de edad postnatal y por esta razón, no se presentan datos de los parámetros morfológicos o de mecánica muscular para animales malnutridos de 60 y 90 días de edad.

Tabla M1.- Características de las dietas proporcionadas a los animales control, desnutridos y malnutridos. La mortalidad en el lote de animales desnutridos fue de  $19 \pm 1\%$  y en las camadas de ratas con malnutrición proteínica fue de  $37 \pm 2\%$ .

<b>CONTROL</b>	<b>MADRES:</b> Ratas Wistar adultas (250-300 g de peso), mantenidas con agua y alimento (Formulab 5008, LabDiet) ad libitum durante el apareamiento, la gestación y la lactancia <b>CRÍAS:</b> 8 crías/camada mantenidas junto a la madre desde el nacimiento hasta el destete (~21 días postnatales) y posteriormente con agua y alimento ad libitum.
<b>DESNUTRICION</b>	<b>MADRES:</b> Ratas Wistar adultas (250-300 g de peso), alimentadas desde las tres semanas previas al apareamiento, la gestación y la lactancia con el 50% de la cantidad normal de alimento (Formulab 5008, LabDiet). <b>CRÍAS:</b> 8 crías/camada mantenidas junto a la madre desde el nacimiento hasta el destete (~21 días postnatales) y posteriormente alimentadas con el 50% de la cantidad normal de alimento.
<b>MALNUTRICION</b>	<b>MADRES:</b> Ratas Wistar adultas (250-300 g de peso) alimentadas, desde las 3 semanas previas al apareamiento y durante los periodos de gestación y lactancia, con una dieta baja en proteínas (caseína 6%, Teklad, Madison, WI). <b>CRÍAS:</b> 8 crías/camada mantenidas junto a la madre desde el nacimiento hasta el destete (~21 días postnatales) y posteriormente alimentadas con la dieta baja en proteínas



### **Procedimientos quirúrgicos:**

El registro de la actividad contráctil de los músculos EDL y SOL de las crías control, desnutridas y malnutridas, se efectuó *in vivo* los días 15 (CTL  $n=7$ , DESN  $n=11$ , MALN  $n=11$ ), 25 (CTL  $n=7$ , DESN  $n=11$ , MALN  $n=6$ ), 35 (CTL  $n=8$ , DESN  $n=8$ , MALN  $n=6$ ), 60 (CTL  $n=5$ , DESN  $n=8$ ) y 90 (CTL  $n=10$ , DESN  $n=11$ ) postnatales, los cuales comprenden el período de tiempo en el que se completa el proceso de diferenciación de las fibras musculares (Close, 1964). Cabe señalar que el músculo EDL es el extensor de los dedos de las patas posteriores, mientras que el músculo sóleo es extensor de la rodilla. Los animales fueron anestesiados mediante la aplicación intra-peritoneal de uretano (Sigma; 1.6 g/kg de peso; Komisaruk, Adler y Hutchinson, 1972). Los músculos EDL y SOL fueron expuestos mediante incisiones longitudinales en la piel de las extremidades posteriores. Los músculos fueron identificados y disecados siguiendo las indicaciones anatómicas de Popesko y cols. (1992); se tuvo especial cuidado en mantener intacta la circulación sanguínea durante todo el experimento. Para evitar en lo posible la manifestación de artefactos de índole mecánica durante el registro, tanto la pelvis como la parte distal de la tibia de las extremidades posteriores, se fijaron firmemente a la tabla de disección con alfileres de acero inoxidable. Asimismo, los músculos se mantuvieron en un ambiente húmedo mediante la aplicación continua de solución salina (cloruro de sodio 0.9%) a una temperatura de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante la disección y el experimento. En su oportunidad, el tendón localizado en la parte

distal de cada uno de los músculos se ató con un hilo resistente e indeformable a un miógrafo isométrico (Grass, FT 03B).

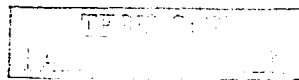
### **Estimulación y registro:**

Para provocar la sacudida simple y la respuesta tetánica de los músculos bajo estudio (control, desnutridos y malnutridos), se utilizó un par de electrodos de estimulación, contruidos con alambre de plata, que fueron colocados sobre la superficie de los músculos. A través de estos se aplicaron pulsos eléctricos únicos o trenes de pulsos durante tres segundos y cuya frecuencia se incrementó gradualmente desde 1 hasta 100 Hertzios (Hz; 1, 10, 20, 30, 40, 50 y 100 Hz), en ambos casos la intensidad (medida en voltios) fue supra-máxima y la duración del estímulo fue de 0.2 ms.

Para estimar la fatigabilidad de los músculos, se les provocó una respuesta tetánica única con un tren de estímulos de intensidad supra-máxima y 100 Hz de frecuencia durante 10 segundos.

Las respuestas contráctiles de los músculos fueron registradas en papel mediante un polígrafo Grass, modelo 79 D.

Para que las fibras musculares puedan desarrollar tensión sobre una articulación es necesario que los elementos elásticos en serie y en paralelo que las unen al hueso (tendones) o que las rodean (tejido conectivo), estén parcial o totalmente estirados (Hill, 1938, Huxley y Niedergeskerke, 1954, Huxley y Hanson, 1954). Para vencer la resistencia que oponen los elementos elásticos es necesario emplear tensión, la cual se denomina tensión pasiva, y ello se logra

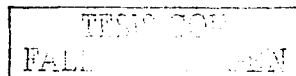


experimentalmente al estirar el músculo a distintas longitudes. Por otra parte, la tensión que desarrollan los elementos contráctiles se denomina tensión activa, la cual se determina durante la contracción isométrica. Por ello, antes de efectuar cualquier tipo de registro de la actividad contráctil de un músculo, en el presente estudio se determinaron las tensiones pasivas y activas producidas al estirar los músculos a 80, 90, 100, 110 y 120 % de su longitud fisiológica y al provocar la contracción muscular en cada una de las longitudes señaladas, respectivamente. Para ello, utilizamos en el presente estudio un sistema milimétrico de engranes, el cual sostenía al miógrafo isométrico y permitía estirar al músculo a las distintas longitudes señaladas. A partir de los datos obtenidos, se determinó la longitud óptima con la cual los músculos podían desarrollar la tensión máxima durante una sacudida simple. Tal longitud óptima fue mantenida en todos los registros de las respuestas contráctiles realizadas a lo largo de las sesiones experimentales.

Al final del experimento, los músculos estudiados fueron separados del animal y pesados (peso húmedo), y se les determinó la relación peso muscular / peso corporal. Finalmente, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

#### **Análisis de datos:**

Posteriormente al día del experimento, se determinaron los siguientes parámetros de las respuestas contráctiles: tiempo al pico, tiempo de relajación, frecuencia de fusión de la respuesta contráctil; tensión al pico de la sacudida simple, tensión máxima desarrollada durante la contracción tetánica y se construyeron las relaciones de tensión pasiva o activa, con respecto al grado de



estiramiento de los músculos (% de longitud). Los datos correspondientes al tiempo de la fase de subida y de caída de la tensión contráctil son expresados en milisegundos (ms); la frecuencia en Hertzios (Hz) y la tensión desarrollada durante la sacudida simple y el tétano expresadas en Newtons por área de sección transversal del músculo ( $\text{N}/\text{cm}^2$ ). El área de sección transversal de los músculos fue estimada al dividir el peso del músculo por su longitud óptima y su densidad específica ( $1.056 \text{ g}/\text{cm}^3$ ; Close, 1972).

La fatigabilidad de los músculos fue inferida a partir de la declinación en la fuerza desarrollada por el músculo durante una estimulación tetánica prolongada ( $100 - \{(\text{tensión al final de la meseta} / \text{tensión al pico inicial}) \times 100\}$ ; Russell, et al 1984b; Elder y Vassallo, 1986).

Los datos obtenidos fueron promediados (promedio  $\pm$  error estándar) y sometidos a la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA de una vía) y posteriormente al análisis de Tukey, para determinar las posibles diferencias entre grupos y tratamientos (Zar, 1974).

## RESULTADOS

### **Peso corporal y muscular.**

La figura R1 y la tabla R1 muestran los valores promedio del peso corporal y del peso de los músculos EDL y SOL de las crías con diferentes edades postnatales y sujetas a los distintos paradigmas de alimentación. Los resultados muestran que en todas las edades estudiadas el peso corporal de los animales desnutridos y malnutridos fue significativamente inferior que el de los animales control (ANOVA, tres categorías con repeticiones;  $p < 0.001$ ). Presentándose a los 35 y 60 días postnatales la mayor reducción de peso en los animales desnutridos y malnutridos, en comparación con los animales control, (DESN: 74.7% y 70.0%; MALN: 81.0% respectivamente; Tabla R1), mientras que la mínima reducción de peso corporal se observó a los 15 días de edad postnatal (DESN: 39.5% y MALN: 60.8%; Tabla R1). Estos resultados concuerdan notablemente con los reportados en otros estudios, a pesar de que en ellos se utilizan procedimientos para producir deficiencias alimentarias diferentes a los utilizados en el presente estudio (Morgane y cols., 1978; Wilson y cols, 1988; Segura, 1993).

En cuanto al peso de los músculos EDL y SOL, se observó en todas las edades estudiadas una disminución significativa en el peso húmedo de ambos músculos en los animales sometidos a desnutrición o malnutrición peri-natal, con respecto a los mismos músculos pero de ratas control (Fig. R1, B y C; Tabla R1).

La disminución del peso muscular probablemente se encuentra asociada a una reducción en la cantidad de proteínas totales, contenidas en los músculos de animales sometidos a deficiencias alimentarias (Howart, 1972; Garlick y cols., 1975; Segura, 1993; Fiorotto y cols., 2000).



Tabla R1. Peso corporal, peso de los músculos EDL y sóleo (promedio  $\pm$  error estándar de la media, E.E. M.), así como la relación peso muscular-peso corporal de ratas control, desnutridas y malnutridas. C = control (n=7-8); D = desnutridos (n = 8 - 11); M = malnutridos (n = 6- 11).

MÚSCULO EDL

Edad (días)	Peso corporal (Pc) (g)			Peso del músculo (Pm) (g)			Pm / Pc		
	C	D	M	C	D	M	C	D	M
15	33.2 $\pm 0.7$	20.1 $\pm 1.1$	13.0 $\pm 1.3$	0.01 $\pm 0.001$	0.005 $\pm 0.001$	0.0034 $\pm 0.001$	0.033 $\pm 0.002$	0.026 $\pm 0.001^*$	0.025 $\pm 0.001^*$
25	78.3 $\pm 15.5$	33.4 $\pm 4.1$	19.9 $\pm 1.2$	0.03 $\pm 0.008$	0.011 $\pm 0.0023$	0.0055 $\pm 0.008$	0.042 $\pm 0.001$	0.035 $\pm 0.001$	0.027 $\pm 0.001^*$
35	147.9 $\pm 17.9$	37.4 $\pm 3.6$	28.1 $\pm 1.6$	0.06 $\pm 0.008$	0.013 $\pm 0.0022$	0.0093 $\pm 0.008$	0.043 $\pm 0.001$	0.036 $\pm 0.002$	0.033 $\pm 0.001^*$
60	360.6 $\pm 18.7$	108.0 $\pm 4.7$	-	0.15 $\pm 0.008$	0.047 $\pm 0.0037$	-	0.043 $\pm 0.001$	0.043 $\pm 0.001$	-
90	488.0 $\pm 60.3$	175.3 $\pm 16.8$	-	0.23 $\pm 0.026$	0.083 $\pm 0.015$	-	0.047 $\pm 0.001$	0.047 $\pm 0.002$	-

MÚSCULO SÓLEO

Edad (días)	Peso corporal (Pc) (g)			Peso del músculo (Pm) (g)			Pm / Pc		
	C	D	M	C	D	M	C	D	M
15	32.5 $\pm 2.5$	20.3 $\pm 1.5$	13.4 $\pm 0.9$	0.012 $\pm 0.002$	0.0065 $\pm 0.002$	0.0035 $\pm 0.0009$	0.037 $\pm 0.001$	0.032 $\pm 0.004$	0.026 $\pm 0.002^*$
25	69.0 $\pm 11.6$	30.9 $\pm 5.3$	19.9 $\pm 1.2$	0.027 $\pm 0.003$	0.012 $\pm 0.003$	0.0056 $\pm 0.0013$	0.039 $\pm 0.002$	0.039 $\pm 0.002$	0.028 $\pm 0.002^*$
35	137.1 $\pm 9.5$	36.3 $\pm 6.9$	24.9 $\pm 3.3$	0.067 $\pm 0.01$	0.015 $\pm 0.004$	0.008 $\pm 0.0015$	0.047 $\pm 0.005$	0.043 $\pm 0.001$	0.032 $\pm 0.002^*$
60	364.1 $\pm 9.9$	107.5 $\pm 5.0$	-	0.15 $\pm 0.018$	0.046 $\pm 0.007$	-	0.041 $\pm 0.002$	0.043 $\pm 0.003$	-
90	475.8 $\pm 2.6$	177.8 $\pm 17.6$	-	0.152 $\pm 0.034$	0.071 $\pm 0.011$	-	0.032 $\pm 0.002$	0.040 $\pm 0.001$	-

El asterisco (\*), indica que el promedio de los tratamientos (desnutrición y malnutrición proteínica) es estadísticamente distinto del promedio del lote control (ANOVA de una vía, el asterisco (\*) significa  $p < 0.01$ ).

Debido a factores fuera de nuestro control, la dieta hipo-proteínica (caseína 6%) solo pudo administrarse a ratas menores de 60 días.

Los valores correspondientes a la relación existente entre el peso muscular y el peso corporal son mostrados en la Tabla R1 y en las gráficas D y E de la figura R1. En las edades postnatales comprendidas entre los 15 y 35 días (Fig. 1 D y E), la relación guardada entre el peso corporal y el peso del músculo (Pc/Pm)

fue significativamente mayor en los músculos EDL y SOL de las ratas malnutridas que en el de las ratas control (Tabla R1, ANOVA simple,  $p < 0.01$ ).

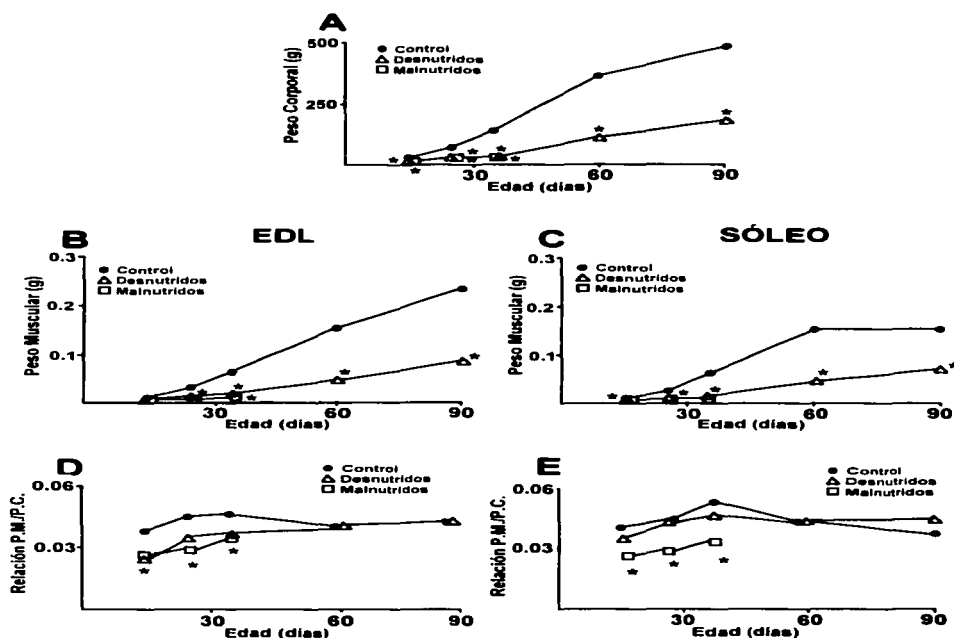


Figura R1.- Relación entre el peso corporal y el de los músculos EDL (A) y sóleo (B), de ratas desnutridas y malnutridas de diferentes edades postnatales. Cada punto representa el promedio de 9 animales. El asterisco (\*) representa  $p < 0.01$  (ANOVA de una vía y posteriormente prueba de Tukey).

En cambio, la relación Pc/Pm de los animales control y desnutridos no mostraron diferencias significativas entre sí, en todas las edades estudiadas (Fig. R1 D y E, Tabla R1). Nuestros resultados son consistentes con los reportados por



Johnson (1991) y Fiorotto y cols. (2000), quienes muestran que la tasa de síntesis y especialmente la degradación de proteínas, se reduce cuando los animales son sometidos a deficiencias alimentarias, pero entre los 10 y 15 días del desarrollo post-natal la relación entre la síntesis y la degradación de proteínas alcanza un equilibrio, de manera que el cociente entre el depósito y la eliminación de proteínas se mantiene constante, a pesar de que el peso corporal del animal permanece reducido (Fig. R1). Lo anterior podría considerarse como un mecanismo de adaptación del animal a su condición alimentaria.

#### **Tensión desarrollada durante la sacudida simple**

Puesto que los músculos de los animales desnutridos y malnutridos presentan un tamaño y peso considerablemente menor que el de los animales control (como se indica en el inciso anterior) y dado que la generación de tensión muscular depende en gran medida del tamaño o peso del músculo, resulta conveniente normalizar la tensión isométrica medida al pico de las respuestas contráctiles (sacudida simple y tétano) con respecto al área de sección transversal del propio músculo (Close, 1972; Kelsen y cols, 1985). La figura R2 y la Tabla R2 muestran los registros y los valores promedio de la tensión por área de sección transversal de los músculos bajo estudio. Tal y como se puede observar en los registros de la figura R2A, las respuestas contráctiles de los músculos EDL desnutridos y malnutridos presentan mayor amplitud (y en consecuencia mayor área) que las respuestas provocadas por los músculos EDL control. Este comportamiento se hace más evidente al graficar los valores promedio ( $\pm$ E.E.) de la tensión normalizada con respecto a la edad de los animales (Fig. R2B).

También se puede observar en esta gráfica, que entre los 15 y 35 días postnatales los músculos EDL desnutridos y malnutridos desarrollan más fuerza por área transversal que los músculos control (ANOVA simple,  $p < 0.001$ ) mientras que a los 60 y 90 días, los músculos EDL experimentales generaron una tensión por área transversal similar a la que generan los músculos control (ANOVA simple,  $p < 0.001$ ).

Tabla R2. Valores promedio ( $\pm E.E.$ ;  $n=9.$ ) de la tensión por área transversal desarrollada durante una sacudida simple por los músculos EDL y SOL de animales control, desnutridos o malnutridos con distintas edades postnatales. C = control ( $n=7-8$ ); D = desnutridos ( $n = 8 - 11$ ); M = malnutridos ( $n = 6- 11$ ).

Edad (días)	EDL ( $N / cm^2$ )			SOL ( $N / cm^2$ )		
	C	D	M	C	D	M
15	1.04	2.83	2.12	0.85	0.68	1.01
	$\pm 0.08$	$\pm 0.34$	$\pm 0.28$	$\pm 0.08$	$\pm 0.06$	$\pm 0.09$
25	1.46	3.88	4.12	1.16	1.33	1.28
	$\pm 0.08$	$\pm 0.25$	$\pm 0.46$	$\pm 0.11$	$\pm 0.08$	$\pm 0.15$
35	3.04	5.71	5.31	0.98	1.46	1.58
	$\pm 0.23$	$\pm 0.65$	$\pm 0.55$	$\pm 0.06$	$\pm 0.1$	$\pm 0.11$
60	3.15	2.51	-	1.08	0.97	-
	$\pm 0.36$	$\pm 0.26$	-	$\pm 0.11$	$\pm 0.05$	-
90	2.99	2.41	-	1.13	1.30	-
	$\pm 0.18$	$\pm 0.18$	-	$\pm 0.05$	$\pm 0.1$	-

En cambio, los músculos SOL de animales desnutridos y malnutridos desarrollan una tensión por área transversal durante la sacudida simple que no es significativamente diferente a la generada por los músculos SOL de animales control (ANOVA simple,  $p < 0.001$ ; Figura R2C y D; Tabla R2) en todas las edades señaladas.

El incremento en la tensión por área de sección transversal podría explicarse de muy diversas maneras, una de ellas estaría relacionada con un posible aumento en la cantidad de elementos contráctiles por área transversal,

contenidas en las miofibras de los músculos EDL desnutridos y no en las miofibras del músculo Sóleo(SOL) o bien a una alteración en los mecanismos que generan

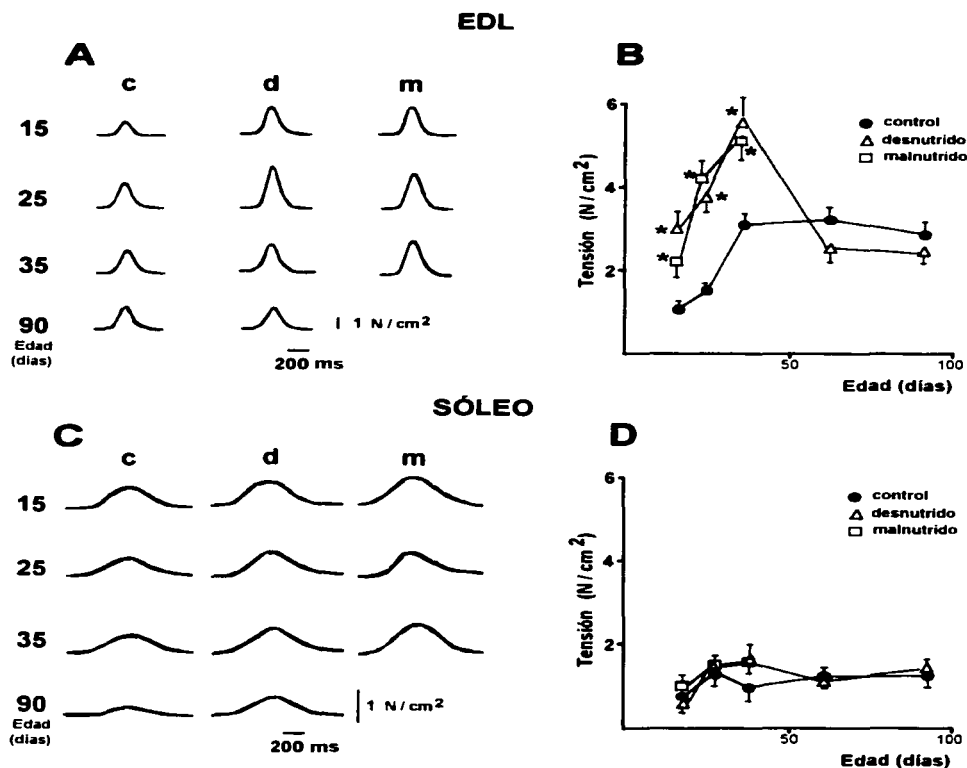


Figura R2. Tensión por área de sección transversal generada por músculos EDL (A y B) y SOL (C y D) de animales control, desnutridos o malnutridos con distintas edades postnatales. Cada punto representa el promedio de 10 músculos, las barras verticales indican el error estándar ( $\pm$ E.E.), \* significa  $p < 0.001$ . C = control ( $n = 7-8$ ); D = desnutridos ( $n = 8-11$ ); M = malnutridos ( $n = 6-11$ ).

la fuerza muscular, por ejemplo un incremento en la liberación y o un enlentecimiento en la recaptura de iones calcio del retículo sarcoplásmico, el cual a su vez estaría probablemente asociado a un ensanchamiento del potencial de acción muscular (Warren y cols. 2001,2002; DiFranco y cols., 2002).

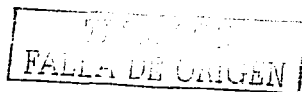
### Tensión desarrollada durante la respuesta contráctil tetánica.

Durante la respuesta tetánica, provocada por trenes de estímulos de frecuencia alta (100 Hz.), los músculos alcanzan la tensión mayor que son capaces de desarrollar (Davson, 1970), lo cual se logra por la activación máxima de todos los elementos contráctiles contenidos en los mismos. Por tal razón en el presente estudio se determinó la tensión máxima tetánica producida por los músculos EDL y SOL de animales control, desnutridos y malnutridos, durante distintos estadios del desarrollo postnatal de la rata.

Tabla R3. Valores promedio  $\pm$  E.E. de la tensión por área de sección transversal de la respuesta tetánica de los músculos EDL y SOL de ratas control (C; n=7-8), desnutridas (D; n = 8 - 11) y malnutridas (M; n = 6- 11).

Edad (días)	EDL (N / cm <sup>2</sup> )			SOL (N / cm <sup>2</sup> )		
	C	D	M	C	D	M
15	3.68 $\pm 0.31$	8.92 $\pm 1.12$	7.66 $\pm 1.7$	3.17 $\pm 0.39$	3.72 $\pm 0.55$	3.18 $\pm 0.53$
25	5.16 $\pm 1.14$	10.77 $\pm 0.84$	11.14 $\pm 1.08$	5.34 $\pm 0.54$	5.7 $\pm 0.26$	5.66 $\pm 0.26$
35	7.8 $\pm 0.5$	13.32 $\pm 1.87$	10.24 $\pm 0.39$	4.99 $\pm 0.4$	6.82 $\pm 0.57$	7.65 $\pm 0.59$
60	7.0 $\pm 0.42$	9.83 $\pm 0.87$	-	5.48 $\pm 0.34$	4.29 $\pm 0.42$	-
90	11.56 $\pm 0.39$	8.55 $\pm 0.38$	-	7.59 $\pm 0.53$	6.06 $\pm 0.66$	-

De igual manera a lo observado en la sacudida simple (ver párrafos anteriores), en una respuesta tetánica los músculos EDL de animales desnutridos



y malnutridos, con edades de entre 15 y 35 días postnatales, desarrollaron mayor tensión por área de sección transversal que los músculos de ratas control de las mismas edades (ANOVA simple,  $p < 0.001$ ; Tabla R3 y Fig. R3A y B) y a los 60 y 90 días, los músculos desnutridos desarrollaron tensiones tetánicas por área transversal semejantes a las producidas por los músculos control con el mismo paradigma de estimulación (intensidad supramáxima y 0.2 ms de duración; Fig. R3B).

Del mismo modo que en la sacudida simple, tampoco se observaron diferencias significativas en la tensión por área de sección transversal que desarrolla el músculo sóleo durante una contracción tetánica en todas las edades estudiadas (Tabla R3 y Fig. R3 C y D). Este resultado podría atribuirse a que en el músculo sóleo predominan las fibras de sacudida lenta y estas no se ven afectadas por las deficiencias alimentarias.

Puesto que la tensión generada durante un tétano es el resultado de la activación máxima de todos los elementos contráctiles del músculo, la observación de que los músculos EDL, pero no los músculos SOL, generen mayor tensión por área transversal durante una respuesta tetánica, en comparación con las respuestas de los mismos músculos pero de animales control, permite suponer que la desnutrición o la malnutrición peri-natales inducen un notorio incremento en la cantidad de elementos contráctiles (miofibrillas o sarcómeras), por área de sección transversal o bien, incrementan la liberación del calcio o enlentecen su recaptura hacia el retículo sarcoplásmico, en los músculos de sacudida rápida, durante los primeros días del desarrollo postnatal de la rata. No obstante, esta

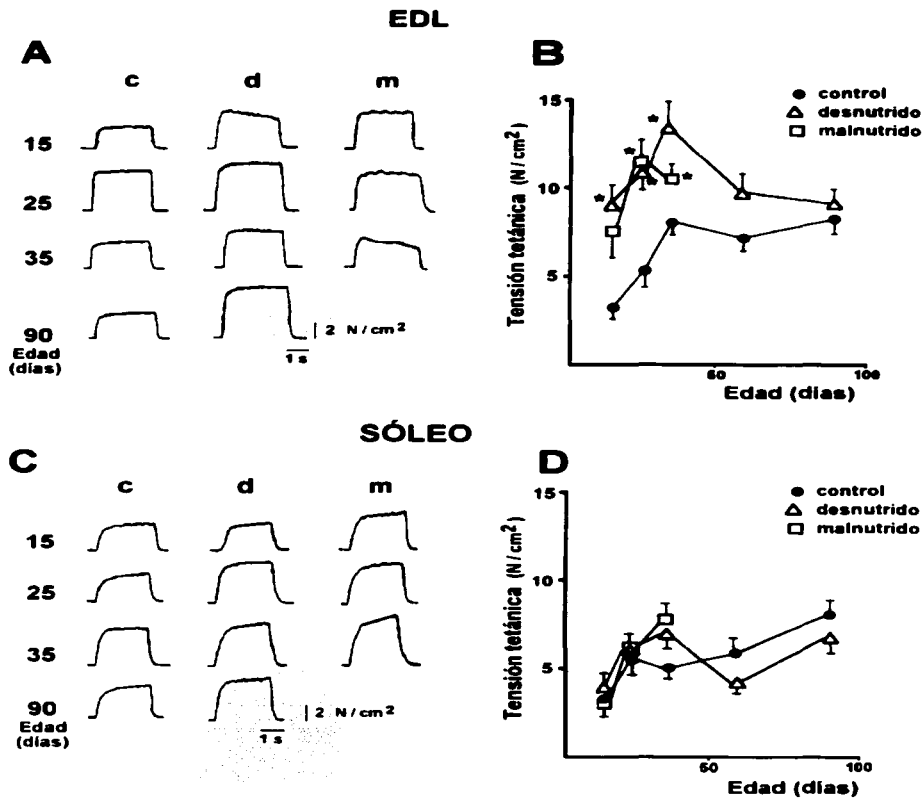


Figura R3. Tensión por área de sección transversal de las respuestas tetánicas provocadas en músculos EDL (A y B) y SOL (C y D) de animales control, desnutridos o malnutridos con distintas edades postnatales. Cada punto es el promedio de 10 músculos, el asterisco (\*) representa  $p < 0.01$ . c = control (n=7-8); d = desnutridos (n = 8 - 11); m = malnutridos (n = 6- 11).

condición del músculo es compensada gradualmente en edades posteriores (60 y 90 días), por lo que podría suponerse que el músculo se adapta a su condición alimentaria.

### **Relación sacudida simple-tétano.**

De existir un incremento en la cantidad o en el número de elementos contráctiles por área transversal, sería de esperar que la activación de éstos, conllevaría a incrementos proporcionales en las tensiones normalizadas desarrolladas durante una sacudida simple y durante un tétano. Es por ello, que en el presente estudio analizamos las relaciones entre las tensiones por área de sección transversal de la sacudida simple y la respuesta tetánica de los músculos control y experimentales. En la Tabla 4 se indican los valores promedio de las relaciones sacudida simple (Ts) - tétano (Tt) correspondientes a los músculos EDL y SOL de ratas control y experimentales. Como se puede apreciar, la proporción sacudida simple-tétano calculada para los músculos desnutridos o malnutridos (EDL y SOL) no muestra diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en los músculos control (ANOVA de una vía,  $p > 0.05$ ).

Los resultados anteriores apoyan la posibilidad de que los incrementos observados en la tensión por área de sección transversal durante una sacudida simple o un tétano en músculos EDL desnutridos o malnutridos resultan de un incremento en el número de miofibrillas o sarcómeros por unidad de área transversal de las fibras musculares rápidas, sin embargo hasta el momento se carece de evidencia experimental que apoye esta propuesta.



Tabla R4. Valores promedio ( $\pm$ E.E.) de la relación sacudida simple-tétano de músculos control, desnutridos y malnutridos obtenidos en distintos días postnatales de la rata. C = control (n=7-8); D= desnutridos (n = 8 - 11); M = malnutridos (n = 6- 11).

Edad (días)	EDL: Ts / Tt			SOL: Ts / Tt		
	C	D	M	C	D	M
15	0.29 $\pm 0.09$	0.32 $\pm 0.1$	0.32 $\pm 0.14$	0.254 $\pm 0.062$	0.208 $\pm 0.043$	0.288 $\pm 0.06$
25	0.41 $\pm 0.1$	0.40 $\pm 0.1$	0.36 $\pm 0.09$	0.237 $\pm 0.052$	0.205 $\pm 0.033$	0.265 $\pm 0.14$
35	0.33 $\pm 0.1$	0.37 $\pm 0.07$	0.56 $\pm 0.09$	0.215 $\pm 0.071$	0.195 $\pm 0.032$	0.222 $\pm 0.094$
60	0.45 $\pm 0.1$	0.25 $\pm 0.057$	-	0.21 $\pm 0.04$	0.23 $\pm 0.07$	-
90	0.23 $\pm 0.4$	0.29 $\pm 0.04$	-	0.15 $\pm 0.018$	0.19 $\pm 0.043$	-

#### Curso temporal de la sacudida simple.

Es bien conocido que la tensión desarrollada por un músculo depende en gran medida de la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el espacio intracelular (Saiki e Ikemoto, 1999, Ikemoto y Yamamoto, 2000). Una mayor salida de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\uparrow I_{\text{Ca}}$ ) del retículo sarcoplásmico (RS), probablemente por un alargamiento del potencial de acción muscular (Saiki e Ikemoto, 1999, Ikemoto y Yamamoto, 2000; DiFranco y cols., 2002) conduciría, en paralelo al incremento en la tensión muscular, a un alargamiento de la duración de la fase inicial de la respuesta contráctil (tiempo al pico) o bien, un decremento en la re-captura del ión  $\text{Ca}^{2+}$  por el RS, probablemente por una disminución de la actividad de la bomba metabólica de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS (Muller y cols, 1994; Martonosi, 1996), traería como consecuencia una mayor permanencia de este ión en el medio intra-fibra, lo que induciría una mayor y más prolongada activación de las proteínas contráctiles, produciendo el aumento de tensión y el alargamiento de la fase de relajación (tiempo de relajación) de la sacudida simple. Por lo anterior, cabría suponer que la relativa



mayor tensión por área de sección transversal que desarrollan los músculos EDL desnutridos o malnutridos es el resultado de una mayor liberación o menor recaptura de  $Ca^{2+}$  por parte del retículo sarcoplásmico. Esta posibilidad la analizamos en forma indirecta, al determinar las características temporales (tiempo al pico y tiempo de relajación) de las respuestas contráctiles provocadas en los músculos de animales control y experimentales con diferentes edades postnatales.

Tabla R5. Valores promedio ( $n=10$ ,  $\pm$  E.E.) de los tiempos al pico y de relajación de la contracción simple de músculos EDL y SOL control y experimentales de la rata en desarrollo. C = control ( $n=7-8$ ); D = desnutridos ( $n = 8 - 11$ ); M = malnutridos ( $n = 6- 11$ ).

#### MÚSCULO EDL

Edad (días)	Tiempo al pico (t p) (ms)			Tiempo de relajación (t r) (ms)		
	C	D	M	C	D	M
15	23.3 $\pm 8.1$	31.8 $\pm 13.2$	40.2 $\pm 13.0$	259.9 $\pm 69.8$	291.9 $\pm 59.1$	275.4 $\pm 69.3$
25	20 $\pm 0$	20 $\pm 0$	20 $\pm 0$	235.7 $\pm 66.2$	262.8 $\pm 49.5$	233.3 $\pm 39.3$
35	33.3 $\pm 10.3$	26.2 $\pm 7.4$	25 $\pm 8.3$	230.0 $\pm 45.1$	261.2 $\pm 46.4$	281.6 $\pm 88.1$
60	36.8 $\pm 7.0$	36.3 $\pm 7.5$	-	214.0 $\pm 41.1$	236.6 $\pm 70.2$	-
90	40.1 $\pm 9.4$	38.8 $\pm 9.5$	-	208.1 $\pm 29.3$	213.0 $\pm 49.3$	-

#### MÚSCULO SÓLEO

Edad (días)	Tiempo al pico (t p) (ms)			Tiempo de relajación (t r) (ms)		
	C	D	M	C	D	M
15	80.0 $\pm 11.5$	71.4 $\pm 10.6$	71.7 $\pm 14.1$	417.1 $\pm 113.9$	422.8 $\pm 71.5$	454.4 $\pm 71.5$
25	58.0 $\pm 25.7$	71.4 $\pm 15.7$	66.6 $\pm 10.3$	458.3 $\pm 102.9$	414.2 $\pm 53.8$	406.5 $\pm 78.2$
35	55.7 $\pm 17.8$	86.1 $\pm 17.0$	61.0 $\pm 21.7$	407.1 $\pm 95.9$	503.0 $\pm 71.5$	428.5 $\pm 78.2$
60	57.3 $\pm 9.7$	54.3 $\pm 10.6$	-	369.6 $\pm 83.4$	345.2 $\pm 55.9$	-
90	49.6 $\pm 3.4$	69.2 $\pm 14.2$	-	294.8 $\pm 77.3$	354.2 $\pm 56.6$	-

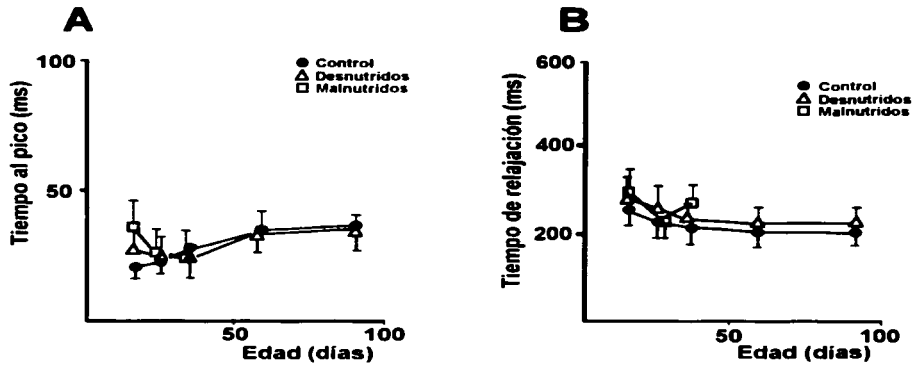
La figura R4 y la tabla R5 muestran los valores promedio de los tiempos al pico y de relajación de las contracciones simples provocadas post-natalmente en los músculos EDL y SOL de ratas sujetas a diferentes condiciones alimentarias peri-natales. Como se puede observar en las gráficas de la figura R4, tanto los tiempos al pico como los correspondientes a la relajación de las contracciones provocadas en los músculos EDL y sóleo son estadísticamente semejantes en los músculos control, desnutrido o malnutrido (ANOVA simple,  $p > 0.05$ ) de todas las edades registradas.

Observaciones semejantes han sido reportadas por Wareham y colaboradores (1982) y por Russell y colaboradores (1983, 1984b) en músculos de animales adultos y desnutridos y nos permiten suponer que la desnutrición o la malnutrición, peri-natal en nuestro caso, no alteran la liberación y/o captura de los iones calcio por el retículo sarcoplásmico de los músculos rápidos y/o lentos de la rata en desarrollo.

#### **Frecuencia de fusión.**

Para tener mayor información del posible efecto que ejercen la desnutrición y la malnutrición sobre las respuestas contráctiles de los músculos esqueléticos, en el presente estudio cuantificamos la frecuencia de fusión de los músculos EDL y SOL, controles y experimentales, en distintos días postnatales. Se ha establecido que la fusión de las respuestas contráctiles a medida que se incrementa la frecuencia de estimulación depende en gran medida de la duración del acople excitación-contracción muscular (Celichowski y Bichler, 2002). Como se muestra en la tabla R6, la frecuencia de fusión de la contracción de los músculos

## EDL



## SÓLEO

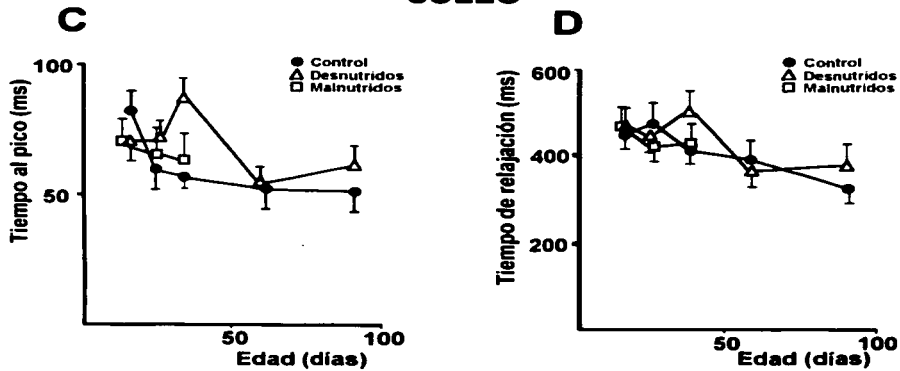


Figura R4.- Tiempos de contracción y de relajación, durante una sacudida simple, de los músculos EDL (A y B respectivamente) y sóleo (C y D respectivamente) de ratas control, desnutridas y malnutridas con distintas edades postnatales. Valores promedio  $\pm$  E.E. (control  $n=7-8$ ; desnutridos  $n=8-11$ ; malnutridos  $n=6-11$ ).

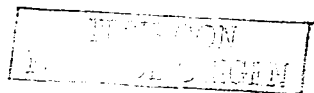
EDL y SOL experimentales no difiere significativamente de aquellas obtenidas en los músculos control en todas las edades postnatales analizadas. De acuerdo a lo establecido con respecto a los tiempos de la sacudida, nuestros resultados permiten concluir que la alimentación peri-natal deficiente en cantidad o calidad no altera el desarrollo del acople excitación-contracción de los músculos rápidos o lentos.

Tabla R6. Valores promedio ( $\pm$  E.E.) de la frecuencia de fusión en la que se fusiona la respuesta contráctil de los músculos EDL y SOL de los animales control y experimentales. C = control (n=7-8); D = desnutridos (n = 8 - 11); M = malnutridos (n = 6- 11).

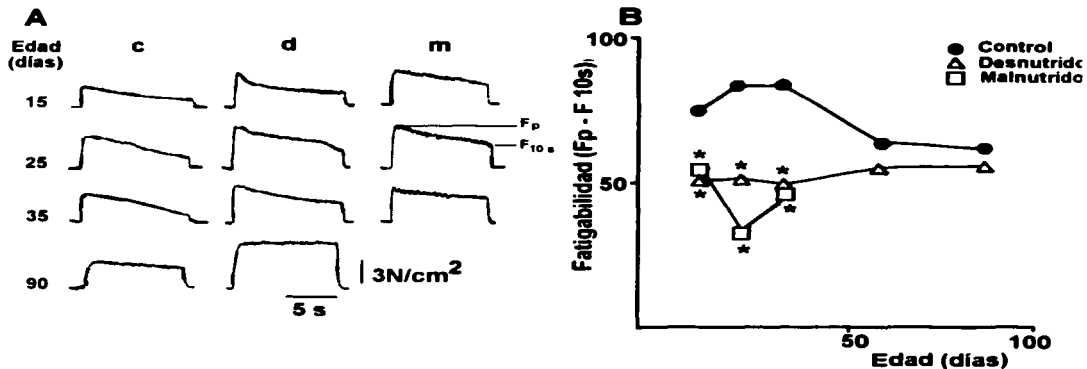
Edad (días)	EDL: Frecuencia de fusión (Hz)			SOL: Frecuencia de fusión (Hz)		
	C	D	M	C	D	M
15	26.4 $\pm 5.5$	21.8 $\pm 2.5$	21.5 $\pm 4.7$	15 $\pm 0$	15.7 $\pm 1.8$	15 $\pm 0$
25	30.7 $\pm 3.4$	24.5 $\pm 3.5$	27.5 $\pm 2.7$	17.5 $\pm 2.6$	16.4 $\pm 2.5$	16.6 $\pm 2.5$
35	25 $\pm 3.7$	21.8 $\pm 2.5$	25.8 $\pm 2.0$	17.1 $\pm 3.2$	15 $\pm 0$	15 $\pm 3.3$
60	18 $\pm 2.7$	20 $\pm 0$	-	14.1 $\pm 2.0$	13.5 $\pm 2.4$	-
90	19 $\pm 2.1$	20.9 $\pm 3.0$	-	11.8 $\pm 2.5$	11.9 $\pm 2.5$	-

### Fatigabilidad.

El aumento relativo de la tensión normalizada de los músculos EDL desnutridos y malnutridos podría explicarse si se considera una posible alteración en el tipo de fibras presentes en los músculos esqueléticos durante el desarrollo postnatal de la rata. Para discernir la posibilidad de que la desnutrición o la malnutrición influyen en la diferenciación postnatal de las fibras musculares, en el presente estudio utilizamos el índice de fatigabilidad como una medida indirecta de



## EDL



## SÓLEO

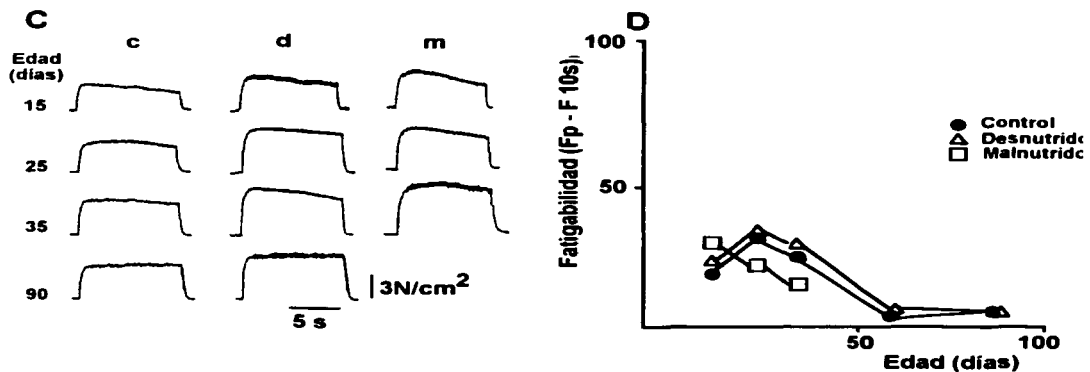


Figura R5. A y C. Fatigabilidad de los músculos EDL y SOL controles y desnutridos de diferentes edades postnatales. La fatigabilidad fue cuantificada a partir de la declinación en la fuerza desarrollada por el músculo durante una estimulación tetánica prolongada (100-[tensión al final de la meseta;  $F_{10s}$  / tensión al pico inicial;  $f_p$ ] $\times 100$ ). B y D. Gráficas que ilustran las variaciones del índice de fatigabilidad que presentan los músculos bajo estudio en distintos estadios postnatales.

la probable proporción de fibras de sacudida lenta, no fatigables (tipo I), de sacudida rápida no fatigables (tipo IIA o IIX) o de fibras rápidas pero fatigables (tipo IIB; Fiorotto y cols., 2000), presentes en los músculos EDL y SOL de animales con distintas edades postnatales.

La figura R5 muestra los registros de las respuestas tetánicas prolongadas (10 s) que se generan en los músculos EDL (Fig. R5 A) y SOL (R5 C) de animales control, desnutridos y malnutridos en distintas edades postnatales. Como se puede observar, la fase de meseta de la respuesta tetánica de los músculos EDL control presenta una mayor caída de tensión que la mostrada en las respuestas de los músculos desnutridos o malnutridos. (Fig. R5 A), mientras que la meseta de la respuesta tetánica de los músculos SOL experimentales es prácticamente similar a la de los músculos control (Fig. R5 C).

Tabla R6. Índice de fatigabilidad de los músculos EDL y SOL de animales control y experimentales con distintas edades postnatales. C = control (n=7-8); D = desnutridos (n = 8 – 11); M = malnutridos (n = 6- 11).

Edad (días)	EDL: Índice de Fatigabilidad			SOL: Índice de Fatigabilidad		
	C	D	M	C	D	M
15	73.3 ±7.4	51.3 ±3.9	55.8 ± 4.2	29.6 ±2.7	36.3 ±3.7	37.2 ±3.8
25	82.4 ±4.5	51.5 ±2.2	31.8 ±3.3	38.7 ±6.1	40.9 ±12.3	27.5 ±3.8
35	82.6 ±5.3	42.6 ±7.6	45.3 ±4.8	27.9 ±4.5	25.6 ±2.6	16.2 ±2.9
60	64.9 ±3.9	53.8 ±2.6	-	4.1 ±1.8	6.0 ±1.5	-
90	63.3 ±2.8	56.4 ±3.3	-	5.5 ±1.6	4.2 ±0.9	-

Este mismo comportamiento se puede observar en las gráficas B y D de la figura R5 y en la tabla R6, en donde se indican los valores promedio del índice de fatigabilidad de los músculos. Como se puede observar en la figura R5 B, entre los



15 y 35 días postnatales, la fatigabilidad de los músculos EDL controles fue significativamente mayor (ANOVA,  $p < 0.005\%$ ) que la de los músculos experimentales y entre los 60 y 90 días postnatales, tanto los músculos control como los desnutridos manifiestan índices de fatigabilidad semejantes (Fig. R5 A y B;  $p > 0.05$ ). En contraste, los valores del índice de fatigabilidad obtenidos en los músculos SOL de animales control y experimentales, no mostraron diferencias significativas entre sí en todas las edades postnatales exploradas (Fig. R5 C y D; ANOVA,  $p > 0.05$ ). Lo anterior podría sugerir que la desnutrición o la malnutrición peri-natal ejerce un efecto altamente selectivo sobre el desarrollo postnatal de las fibras musculares de sacudida rápida.

#### **Tensión pasiva y tensión activa.**

Para establecer si la desnutrición o la malnutrición afectan únicamente a los elementos contráctiles o también alteran los elementos elásticos de los músculos, en este estudio determinamos la tensión pasiva y activa que los músculos EDL y SOL, controles y experimentales, son capaces de realizar al ser estirados a distintas longitudes con respecto a la longitud fisiológica de reposo.

Las Tablas R8 y R9 y las figuras R6 y R7 ilustran los valores promedio de las tensiones pasivas y activas, respectivamente, que se generan en distintas longitudes de los músculos EDL y SOL de animales control y experimentales, a los 15, 25 y 35 días postnatales.

Tabla R8. Tensión pasiva por área transversal generada en respuesta al cambio porcentual de longitud de los músculos EDL (I) y sóleo (II) de ratas control (C;  $n = 7-8$ ), desnutridas (D;  $n = 8 - 17$ ) y malnutridas (M;  $n = 6 - 17$ ).

I. EDL: Tensión pasiva

Long. (% Lo)	Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 15 días			Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 25 días			Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 35 días		
	C	D	M	C	D	M	C	D	M
80	44.54 ±12.8	30.42 ±10.5	32.51 ±10.9	15.34 ±4.51	32.7 ±12.22	18.56 ±11.5	20.11 ±8.22	11.96 ±1.13	30.24 ±18.2
90	63.46 ±16.3	40.41 ±14.8	67.76 ±28.62	35.54 ±8.72	78.02 ±11.34	62.06 ±21.5	44.15 ±14.2	26.24 ±4.31	67.86 ±25.1
100	92.71 ±11.8	79.9 ±26.9	185.15 ±46.79	105.07 ±56.48	187.21 ±63.51	114.0 ±36.0	126.5 ±42.7	118.7 ±32.5	247.9 ±43.6
110	304.6 ±48.1	497.81 ±252.1	514.62 ±118.4	280.67 ±58.3	543.47 ±159.5	617.0 ±228	369.5 ±212	852.9 ±354	1576 ±588
120	-	1229.8 ±176.5	1087.6 ±462.9	32.70 ±12.22	1174.4 ±167.2	1904 ±125.	881.6 ±100	3551 ±761	2013 ±1870

II. SOL: Tensión pasiva

Long. (%Lo)	Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 15 días			Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 25 días			Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 35 días		
	C	D	M	C	D	M	C	D	M
80	18.66 ±8.16	15.29 ±3.75	17.6 ±0.91	21.4 ±7.01	64.96 ±21.0	38.51 ±9.51	26.87 ±7.92	30.11 ±7.71	13.82 ±3.61
90	38.79 ±14.7	24.8 ±5.37	20.74 ±7.55	60.72 ±18.82	88.46 ±63.93	80.86 ±69.2	40.24 ±7.95	48.19 ±17.2	52.65 ±24.3
100	128.8 ±33.1	47.2 ±14.2	58.78 ±15.23	121.75 ±38.73	155.55 ±101.5	252.9 ±184.	115.7 ±26.4	109.4 ±19.8	111.1 ±31.0
110	365.72- ±182.	47.59 ±7.56	123.73 ±6.78	188.41 ±58.77	1067.4 305.4	1325 ±315	183.5 ±44.7	153.8 ±61.5	456.3 ±253
120	638.4 ±182.	204.51 ±42.18	170.06 ±58.6	327.69 ±198.2	1188.8 ±249.6	2016 ±1004	231.4 ±91.7	786.8 ±80.9	855.7 ±456

El análisis de los datos en la tabla R8 y en las curvas de tensión-longitud de la figura R6, correspondientes a los músculos en reposo (tensión pasiva), nos muestran que en las tres edades estudiadas (15, 25 y 35 días postnatales), la tensión por área de sección transversal que se requería para vencer la resistencia de los elementos elásticos en los músculos EDL de ratas desnutridas y malnutridas, es considerablemente mayor (entre 60 y 340%) en las longitudes 110 y 120%, que la necesaria para estirar los músculos controles a las mismas longitudes (Fig. R6 A, C y E).



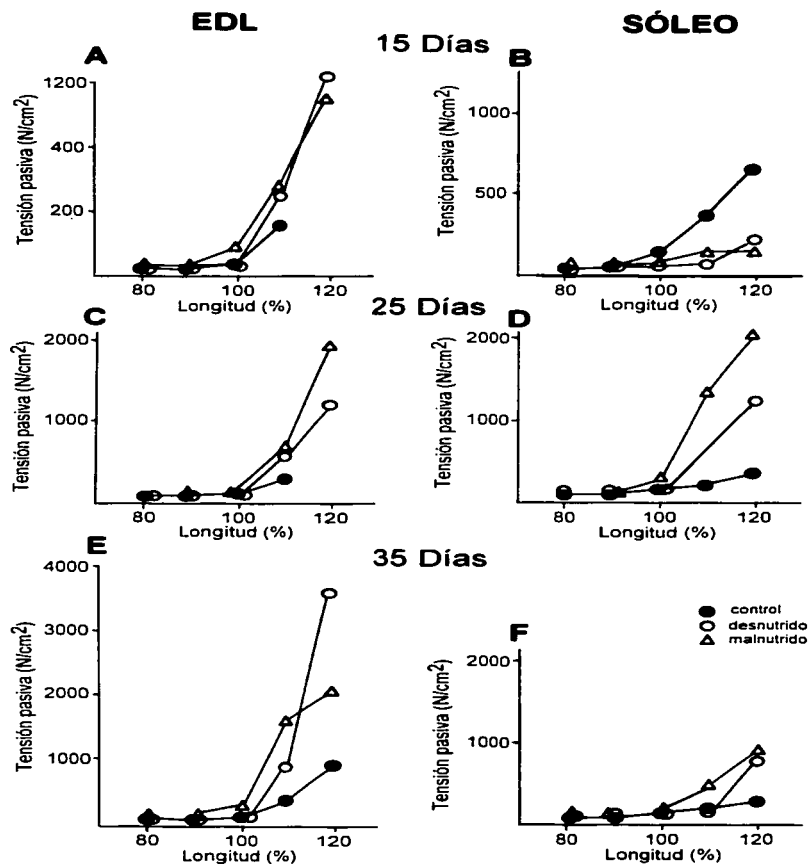


Figura R6. Curvas tensión pasiva-longitud de los músculos EDL y SOL correspondientes a las edades de 15 (A y D), 25 (B y E) y 35 (C y F) días de edad postnatal; control ( $n = 7-8$ ), desnutridas ( $n = 8-11$ ) y malnutridas ( $n = 6-11$ ).

En cambio, la tensión pasiva por área transversal de los músculos SOL controles y desnutridos presentó un comportamiento que dependía de la edad de los animales. A los 15 días postnatales, la tensión normalizada que se desarrolla en los músculos SOL desnutridos y malnutridos fue considerablemente menor que la ejercida en los músculos control (aproximadamente un 60-70%; Tabla R8 y Fig. R6 B).

En contraste, a los 25 días se observó que los músculos experimentales requerían de una mayor tensión (entre 300 a 500%) por área transversal que los músculos controles (Tabla 8 y Fig. R6 D). En cambio, a los 35 días de edad postnatal los músculos SOL experimentales aún requerían de mayor tensión por área transversal que los músculos control, aunque esta fue considerablemente inferior a la observada a los 25 días postnatales (Tabla 8 y Fig. R6F). Lo anterior nos permite suponer que la desnutrición y la malnutrición provocaron un incremento en la cantidad de elementos elásticos en serie o en paralelo presentes en el músculo EDL, de sacudida rápida y también en el músculo SOL, de sacudida lenta, aunque en este último dicho incremento es de menor proporción que el observado en el músculo rápido. Esta observación es consistente con lo reportado en las secciones previas en el sentido de que las dietas deficientes en calidad (malnutrición) o en cantidad (desnutrición) afectan principalmente a los músculos de sacudida rápida.

Por otra parte, la tensión activa por área de sección transversal generada durante una sacudida simple de los músculos EDL y SOL controles y experimentales depende en gran medida de la longitud del músculo. Como se puede apreciar en las gráficas A-F de la figura R7, la tensión máxima que son

capaces de desarrollar ambos tipos de músculos en una sacudida simple, en todas las edades e independientemente de la condición alimentaria, ocurre cuando la longitud del músculo coincide con la longitud fisiológica de reposo del músculo (100%).

Tabla R9. Tensión activa por área transversal desarrollada durante una sacudida simple provocada a diferentes longitudes porcentuales de los músculos EDL (I) y sóleo (II) de ratas control (C;  $n = 7-8$ ), desnutridas (D;  $n = 8 - 11$ ) y malnutridas (M;  $n = 6- 11$ ). Valores promedio  $\pm$  E.E.

I. EDL: Tensión activa

Long. (% Lo)	Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 15 días			Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 25 días			Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 35 días		
	C	D	M	C	D	M	C	D	M
80	42.28 $\pm 12.8$	52.87 $\pm 30.27$	74.95 $\pm 4.94$	26.64 $\pm 2.65$	230.06 $\pm 97.81$	79.12 $\pm 24.0$	149.5 $\pm 38.1$	145.8 $\pm 100$	191.4 $\pm 32.8$
90	67.64 $\pm 11.7$	231.2 $\pm 47.85$	103.94 $\pm 11.29$	83.32 $\pm 15.25$	372.66 $\pm 11.17$	265.2 $\pm 62.2$	196.0 $\pm 47.4$	468.7 $\pm 119$	490.2 $\pm 94.3$
100	100.5 $\pm 16.6$	295.36 $\pm 65.3$	171.54 $\pm 44.01$	157.03 $\pm 29.33$	381.74 $\pm 113.2$	372.1 $\pm 74.5$	294.6 $\pm 63.4$	627.2 $\pm 156$	562.4 $\pm 99.8$
110	86.31 $\pm 34.2$	137.33 $\pm 19.8$	124.43 $\pm 17.22$	110.94 $\pm 24.52$	231.35 $\pm 83.4$	186.6 $\pm 61.5$	248.5 $\pm 71.0$	426.0 $\pm 196$	183.1 $\pm 44.6$
120	-	53.69 $\pm 14.93$	-	-	150.9 $\pm 27.77$	73.41 $\pm 20.9$	43.57 $\pm 17.0$	57.15 $\pm 14.5$	55.67 $\pm 35.4$

II. SOL: Tensión activa

Long. (% Lo)	Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 15 días			Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 25 días			Tensión (N/cm <sup>2</sup> ) 35 días		
	C	D	M	C	D	M	C	D	M
80	29.7 $\pm 17.3$	29.33 $\pm 12.42$	44.96 $\pm 19.25$	46.0 $\pm 17.13$	48.88 $\pm 19.57$	54.31 $\pm 23.6$	67.72 $\pm 16.6$	68.47 $\pm 16.9$	67.07 $\pm 21.1$
90	52.96 $\pm 15.5$	48.13 $\pm 7.94$	58.75 $\pm 25.74$	70.42 $\pm 15.46$	95.38 $\pm 18.83$	122.0 $\pm 14.9$	88.71 $\pm 19.6$	108.7 $\pm 23.2$	98.84 $\pm 31.9$
100	80.77 $\pm 25.0$	69.58 $\pm 17.5$	98.07 $\pm 41.97$	128.46 $\pm 28.64$	125.96 $\pm 12.39$	146.7 $\pm 34.5$	116.1 $\pm 24.4$	136.9 $\pm 23.2$	141.4 $\pm 30.1$
110	37.64 $\pm 12.3$	42.65 $\pm 12.57$	59.71 $\pm 29.86$	68.47 $\pm 13.18$	-	106.6 $\pm 10.8$	69.95 $\pm 13.6$	85.18 $\pm 14.2$	108.2 $\pm 26.3$
120	35.91 $\pm 21.4$	31.52 $\pm 8.69$	9.93 -	48.96 $\pm 25.1$	82.5 $\pm 43.77$	91.46 $\pm 11.9$	52.05 -	49.99 $\pm 10.3$	90.85 $\pm 16.4$

En las gráficas A, B y C y de la figura R7 también puede observarse que la tensión activa por área transversal desarrollada por los músculos EDL desnutridos y malnutridos en una sacudida simple es significativamente mayor (ANOVA simple,  $p > 0.005$ ), particularmente entre el 90 y el 110 % de la longitud de reposo,

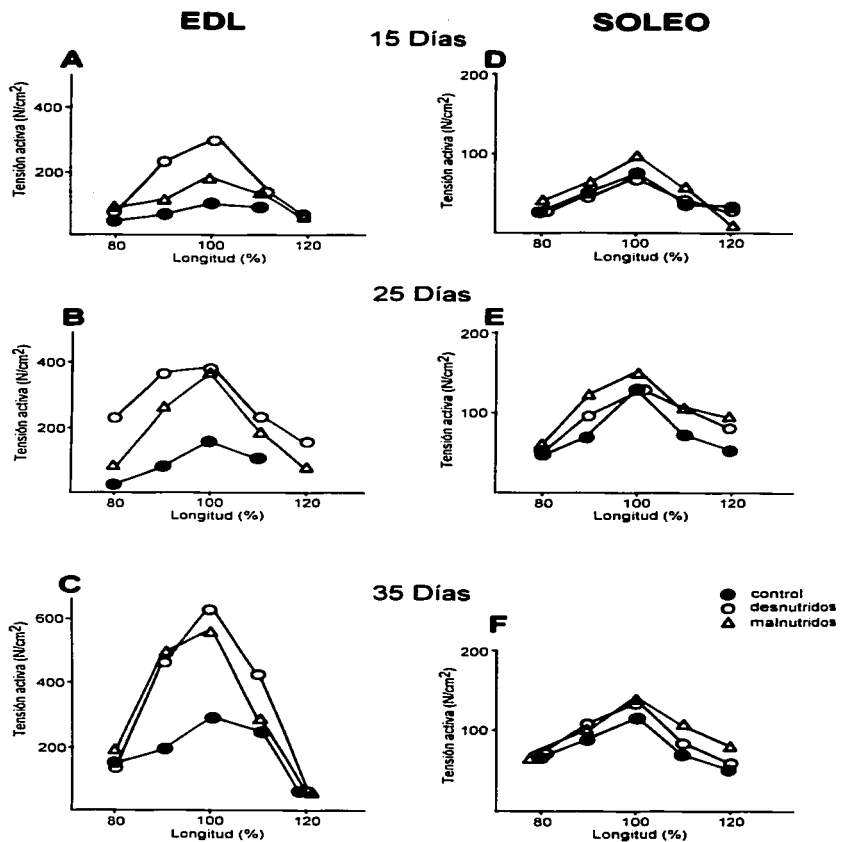


Figura R7. Curvas tensión activa-longitud de los músculos EDL y SOL correspondientes a las edades de 15 (A y D), 25 (B y E) y 35 (C y F) días de edad postnatal; control ( $n = 7-8$ ), desnutridas ( $n = 8 - 11$ ) y malnutridas ( $n = 6 - 11$ ).

que la generada por los músculos EDL control, a las mismas longitudes (Tabla R9-I). En cambio, la tensión activa normalizada por los músculos SOL de animales desnutridos y malnutridos no presentaba diferencias significativas (ANOVA simple,  $p > 0.005$ ) con respecto a las tensiones desarrolladas por los músculos SOL control (Fig. R7 D-F y Tabla R9 II).

Las observaciones anteriores nos permiten proponer que las deficiencias alimentarias peri-natales empleadas ejercen un efecto selectivo sobre los elementos contráctiles de los músculos de contracción rápida, como el EDL mientras que no afecta los de los músculos de sacudida lenta, como el sóleo.

## DISCUSIÓN

En la rata recién nacida, el músculo esquelético no solo es el tejido que acumula mayor cantidad de proteínas de todo el cuerpo, sino que también presenta grandes cambios en la composición y en la funcionalidad de tales proteínas durante el desarrollo postnatal, lo que provoca alteraciones importantes en el patrón contráctil de los músculos en desarrollo (Close, 1964; 1972). Por otra parte esta secuencia de cambios, ocurridos en la vida post-natal temprana de los animales, hace muy susceptible al músculo esquelético a la disminución de la cantidad (desnutrición) o calidad (malnutrición proteínica) del alimento ingerido. Así, los músculos EDL y SOL de ratas desnutridas y malnutridas durante los períodos de gestación y lactancia presentan una notoria disminución en su peso, lo cual podría correlacionarse con la reducción en el número (Ihemelandu, 1985) y/o en el diámetro de las fibras musculares (Haltia y cols, 1978; Howells y Jordan, 1978, Howells y cols., 1978; Sieck y cols., 1989).

A su vez, tal disminución en el número y/o el diámetro de las fibras musculares de animales sometidos a deficiencias alimentarias perinatales, podría estar asociada a una disminución en la cantidad de hormonas, particularmente a las de origen tiroideo, así como las hormonas del crecimiento, los gluco-corticoides y la insulina (siendo esta última considerada como factor de crecimiento durante el desarrollo fetal), cuya carencia o déficit disminuye no solamente la capacidad anabólica del músculo en desarrollo (Howart, 1972; Desai y cols., 1996; Brameld y cols., 1998), sino también impide o retrasa la transformación de las fibras de sacudida lenta, características del recién nacido, en fibras de sacudida rápida o lenta características del adulto (dependiendo esto último del tipo de músculo,

rápido, lento o mixto, que las contendrá; Desai y cols., 1996; Brameld y cols., 1998; Lewis y cols., 2000).

La evidencia experimental obtenida en este estudio, ilustra las alteraciones producidas por deficiencias alimentarias peri-natales, en cantidad (desnutrición) o calidad (malnutrición) sobre algunas de las propiedades contráctiles de los músculos esqueléticos durante el desarrollo postnatal de la rata.

La observación más sorprendente que se obtuvo en este trabajo, fue la mayor tensión por área de sección transversal que desarrollaron los músculos EDL desnutridos o malnutridos, durante una sacudida simple o un tétano, con respecto a la obtenida en los músculos EDL control. Ello contrastó con la ausencia de efecto de las deficiencias alimentarias peri-natales sobre las respuestas contráctiles de los músculos SOL. Lo anterior fue corroborado al analizar las curvas de tensión activa con respecto a la longitud del músculo, en las que se muestra que los músculos EDL experimentales desarrollan mayor fuerza activa que los músculos control, mientras que los músculos SOL desnutridos o malnutridos desarrollan una tensión similar a la de los músculos SOL controles. Estas observaciones nos permiten proponer que la desnutrición y la malnutrición ejercen un efecto altamente selectivo sobre los elementos contráctiles de las fibras musculares de contracción rápida y no sobre los elementos contráctiles de las fibras musculares lentas.

Estas observaciones son consistentes con estudios previos, en los que se reporta que los animales alimentados con dietas deficientes incrementan la cantidad de fibras musculares de sacudida lenta o posiblemente de fibras rápidas

resistentes a la fatiga, a costa de las fibras de sacuda rápida (fatigables), que disminuyen su número (White y cols, 2000).

Por otra parte, la preservación de las fibras musculares de sacudida lenta posiblemente esté relacionado con el hecho de que ellas son componentes importantes de los músculos antigravitarorios y cualquier alteración en su función podría comprometer la vida del animal ya que le impediría contrarrestar la acción de la gravedad y estabilizar su cuerpo en respuesta a cambios en el medio ambiente o durante el inicio de movimientos voluntarios, como la locomoción (Brocard y cols., 1999).

Lo anterior nos permite proponer que la desnutrición y la malnutrición ejercen un efecto altamente selectivo sobre los elementos contráctiles de las fibras musculares de contracción rápida y no sobre los elementos contráctiles de las fibras musculares lentas.

No obstante, al explorar el papel que juegan los elementos elásticos presentes en los músculos de animales control, desnutridos y malnutridos, mediante las curvas de tensión-longitud pasiva, observamos que la cantidad de éstos aumentó significativamente en el músculo EDL de animales desnutridos y malnutridos, lo cual también pudo haber contribuido a incrementar la tensión desarrollada por  $\text{cm}^2$  que desarrollan los músculos EDL de animales sometidos a dietas deficientes en cantidad o en calidad. El incremento observado en la tensión por área de sección transversal desarrollada por el músculo sóleo de animales desnutridos y malnutridos de 25 días, tanto en la sacudida simple (Fig. R2) como en el tétano (Fig. R3), probablemente sea provocado únicamente por el



incremento en la cantidad de elementos elásticos en serie y en paralelo ocurrido a esta edad (Fig. R6).

El incremento relativo de la tensión por área transversal de los músculos EDL desnutridos y malnutridos podría explicarse si se consideran distintas posibilidades, detallándose a continuación algunas de ellas.

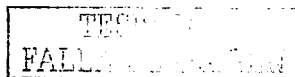
Es bien conocido que un incremento en la liberación o una reducción de la captura de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico induce un aumento en la tensión desarrollada, y alteraciones en el curso temporal y en la frecuencia de fusión de las respuestas contráctiles de los mismos (Davson, 1970). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la duración (tiempo al pico y tiempo de relajación) y la frecuencia de fusión de la respuesta contráctil de los músculos EDL y SOL control, desnutridos y malnutridos no mostraron diferencias significativas entre sí. Estos resultados permiten suponer que los procesos de liberación o de re-captura de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  del RS permanecen sin alteraciones a pesar de la alimentación peri-natal deficiente, impuesta a los animales en desarrollo.

Por otra parte, el incremento relativo de la tensión por área de sección transversal observado tanto en la sacudida simple como en la respuesta tetánica de los músculos EDL desnutridos o malnutridos, pero no en los músculos SOL, podría ser por sí mismo, indicativo de la existencia de una mayor cantidad o número de elementos contráctiles (miofibrillas o sarcómeras) en las fibras musculares rápidas desnutridas. Recientemente, Fiorotto y colaboradores (2000) reportaron una reducción en la síntesis de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas en los músculos de ratas (con edades entre 5 y 15 días postnatales), la cual

estaba asociada a la desnutrición de los animales. Además, estos autores mostraron que ese efecto se veía minimizado por un decremento en la degradación de las proteínas, lo cual permitiría mitigar en parte las alteraciones que produce la desnutrición sobre el contenido miofibrilar de las fibras musculares durante el desarrollo. Sin embargo, en el análisis histo-químico realizado en el estudio anterior se utilizaron los músculos rápidos, plantaris, tibialis anterior y EDL, así como del músculo mixto gastrocnemio, el cual contiene una proporción relativamente grande de fibras de contracción lenta, no fatigables y de fibras rápidas, poco fatigables, así como de fibras musculares rápidas fatigables (Munson y cols. 1984), lo que podría enmascarar los resultados obtenidos en ese estudio, ya que en el análisis bioquímico se combinaron fibras musculares con diferentes tipos de metabolismo (oxidativo y glucolítico o ambos) y distintas capacidades contráctiles.

Es importante señalar que el incremento en la tensión por área de sección transversal observado en los músculos EDL desnutridos o malnutridos sea necesariamente el resultado de un aumento en la cantidad de elementos contráctiles presentes en las fibras musculares. Por ejemplo, la disminución del volumen sarcoplásmico conduciría a una reducción del diámetro o área transversal y al mismo tiempo, a un aumento de la densidad de miofibrillas en las fibras musculares.

Goldspink y Ward en 1979, mostraron en los músculos bíceps brachii (rápido) y sóleo del ratón, desnutrido en etapas postnatales tempranas (a partir de los 30 ó 50 días y 90 días de edad, respectivamente) que las fibras musculares rápidas a diferencia de las lentas, presentaban cambios significativos en su



diámetro. Ahora bien, si se considera que la reducción del diámetro de las fibras musculares rápidas se acompaña de un incremento en la densidad de miofibrillas por unidad de área transversal, ello traería como consecuencia un incremento de la tensión por área transversal desarrollada por las fibras musculares, tal como el observado en este estudio para el músculo EDL desnutrido. Para probar esta hipótesis es necesario efectuar mediciones morfológicas (cortes histológicos) o bioquímicas (cantidad de proteínas por gramo de peso húmedo y seco), que nos permitan conocer si la densidad de elementos contráctiles se incrementó en los animales alimentados con dietas deficientes en calidad (malnutrición proteínica) o en cantidad (50% de alimento).

Otra posible explicación del incremento relativo de la tensión por área transversal de los músculos EDL desnutridos y malnutridos estaría asociada a una probable alteración de la transformación de las fibras musculares lentas en el nacimiento, a rápidas en el adulto, lo cual traería aparejado cambios en la proporción de fibras de sacudida lenta o rápida, presentes en los músculos en desarrollo.

Los músculos esqueléticos de animales maduros contienen 4 tipos de miofibras, que se encuentran en diversas proporciones: a) Fibras del tipo I, que presentan características de contracción lenta y un metabolismo energético oxidativo; b) Fibras del tipo IIA que son rápidas y con metabolismo oxidativo-glucolítico; c) Tipo IIX, rápidas y glucolíticas-oxidativas; y d) Tipo IIB, rápidas y glucolíticas. Las fibras musculares en el recién nacido presentan características contráctiles de sacudida lenta y su maduración a fibras rápidas o lentas del músculo adulto se lleva a cabo a través de la secuencia de varios pasos, cada uno

caracterizado por la presencia de un tipo particular de isoforma de la cadena pesada de meromiosina (MHC). En el caso de las fibras de contracción rápida en el adulto, se sigue la secuencia postnatal:  $MHC_{\text{embrionaria}} - MHC_{\text{fetal}} - MHC_{\text{neonata}} - MHC_{\text{adulta}}$ , la cual puede ser seguida post-natalmente a través de su expresión en los tipos de fibras I – IIA – IIX – IIB, respectivamente (Schiaffino y Reggiani, 1994; Lefaucheur y cols., 1998; McKoy y cols., 1998).

Una de las propiedades contráctiles que caracterizan a las fibras lentas oxidativas y rápidas oxidativas-glucolíticas o glucolíticas-oxidativas y que las diferencian de las fibras rápidas glucolíticas, es su resistencia a la fatiga (Sieck y cols., 1996). Por ello, en este estudio utilizamos la fatigabilidad de la respuesta tetánica de los músculos como un índice de la transformación postnatal de las fibras musculares durante el desarrollo de la rata. Nuestros resultados indican que a edades tempranas (entre los 15 y 35 días), los músculos EDL desnutridos y malnutridos son más resistentes a la fatiga que los músculos EDL controles, mientras que a edades más tardías (entre los 60 y 90 días) poseen similar resistencia a la fatiga. Dado que la fatigabilidad de las fibras lentas de los músculos SOL desnutridos o malnutridos no difiere de la observada en las fibras controles, resulta factible proponer que en los músculos EDL ocurre un retardo en la transición postnatal de las fibras de sacudida rápida y poco fatigables (tipo IIA o IIB) a fibras rápidas y muy fatigables.

Es importante señalar que la mayor resistencia a la fatigabilidad ocurre concomitantemente con una mayor tensión por área transversal y con una mayor proporción de peso muscular, con respecto al peso corporal (ver las Figs. R1, R2 y R6) en los músculos EDL desnutridos y malnutridos en edades postnatales

tempranas. Esto último permitiría sugerir la existencia de una posible relación funcional entre la proporción relativa de un tipo de fibras musculares (probablemente de los tipos IIA o IIB) y la cantidad de elementos contráctiles con el desarrollo de tensión por parte de los músculos con deficiencias alimentarias peri-natales. En este contexto, Brozanski y colaboradores (1993) han demostrado un incremento relativo en la proporción de las isoformas neonatales y lentas de la MHC, así como un decremento en la proporción relativa de la isoforma MHC rápida (en particular del Tipo IIB), presentes en los músculos del diafragma de la rata desnutrida. Estas alteraciones, según los autores, reducen el costo de energía de la contracción e incrementan la resistencia a la fatiga de tales músculos. Sin embargo, esta posibilidad requiere de un análisis experimental más detallado ocupando músculos que contengan predominantemente fibras musculares de contracción rápida.

Es importante señalar que en la actualidad está bien establecido que la desnutrición provoca un ligero hipotiroidismo (Dauncey, 1990), lo que a su vez provoca la persistencia de la isoforma neonatal de la MHC (Brozanski, y cols., 1991) y afecta la transformación de las fibras del tipo IIA a fibras del tipo IIB (Mabuchi y cols., 1982). Asimismo, se ha demostrado que el hipotiroidismo, asociado a la desnutrición, induce una regulación en caída de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa y de la  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasa en el sarcolema y en el retículo sarcoplásmico, respectivamente, lo que mejora aparentemente la eficiencia metabólica de las fibras musculares (Harrison, y cols., 1996).

Por otra parte, se ha demostrado que la capacidad glucolítica de las fibras de sacudida rápida no se modifica durante la desnutrición (Bissonnette y

Jeejeebhoy, 1998), mientras que una desnutrición postnatal ligera produce un incremento en la capacidad oxidativa de todos los tipos de fibras musculares, aumentando la proporción de fibras lentas, oxidativas a expensas de las fibras rápidas glucolíticas (White y cols., 2000). Teniendo en cuenta sus observaciones, White y colegas (2000) proponen que la alimentación postnatal juega un papel crítico en la regulación de la expresión del gene para la miosina y en el fenotipo de la fibra muscular. Sin embargo, lo anterior también podría implicar un incremento en la capacidad energética de aquellos músculos que contienen una gran proporción de fibras oxidativas (tipo I) y oxidativas-glucolíticas (tipo IIA) o glucolíticas-oxidativas (tipo IIX), de tal modo que un incremento en la eficiencia metabólica podría influir en las propiedades contráctiles y en la diferenciación de las fibras musculares rápidas, por ejemplo: en su capacidad para generar tensión o en su resistencia a la fatiga (vease también: Ayling y cols., 1992).

De acuerdo a lo anterior, nuestras observaciones nos permiten suponer que en edades postnatales tempranas, los músculos rápidos de animales desnutridos y malnutridos presentan una gran proporción de fibras rápidas resistentes a la fatiga, las cuales podrían tener un metabolismo altamente eficiente, debido en parte a que han incrementado su capacidad oxidativa (Dauncey y cols., 1994; Katsumata y cols., 1997) sin comprometer su capacidad glucolítica (Bissonnette y Jeejeebhoy, 1998).

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten sugerir que la desnutrición y/o malnutrición producen un retardo en la maduración normal de los músculos de contracción rápida, sin afectar el desarrollo de los músculos de contracción lenta. Afectando de manera específica a la transición de

fibras musculares rápidas, no-fatigables (tipo IIA o IIX) a fibras rápidas pero fatigables (tipo IIB). Tal efecto podría desencadenar diversos procesos metabólicos (por ejemplo: un incremento en la capacidad oxidativa de las fibras musculares, regulado probablemente por las hormonas tiroideas) o de síntesis y degradación de las proteínas contráctiles (incrementando la cantidad de elementos contráctiles), lo que traería como consecuencia el aumento en la tensión desarrollada por los músculos durante una respuesta contráctil (sacudida simple o tétano) y un incremento en la resistencia a la fatiga, como lo observado en este estudio con los músculos EDL desnutridos y malnutridos, durante el desarrollo postnatal de la rata.

## **CONCLUSIONES**

- 1. La desnutrición (50 % de alimento) y la malnutrición proteínica (caseína 6%) perinatales disminuyeron significativamente el peso corporal y el peso de los músculos EDL y sóleo de ratas entre 15 y 90 días de edad.**
- 2. La relación entre el peso muscular y el peso corporal fue significativamente menor para las ratas desnutridas y malnutridas con edades entre 15 y 35 días, pero no para las de 60 y 90 días.**
- 3. La desnutrición y la malnutrición perinatales incrementaron selectivamente la tensión por área de sección transversal desarrollada, durante la sacudida simple y el tétano, por el músculo EDL, pero no la generada por el músculo sóleo de ratas de menos de 60 días de edad.**
- 4. En todas las edades estudiadas, los tiempos al pico y de relajación así como la frecuencia de fusión de la respuesta mecánica, fueron semejantes en los músculos EDL y sóleo de ratas control, desnutridas y malnutridas.**
- 5. El índice de fatigabilidad se redujo exclusivamente en el músculo EDL de ratas desnutridas y malnutridas, con edades de hasta 60 días, comparativamente con el mismo músculo de los animales control.**
- 6. El músculo EDL de animales desnutridos y malnutridos desarrolla mayor tensión por área de sección transversal, pasiva y activa, comparativamente con el mismo músculo de las ratas control.**
- 7. El músculo sóleo incrementa la tensión pasiva por área transversal solo a los 25 días de edad.**



**8. La desnutrición y malnutrición perinatales afectan selectivamente a las fibras de sacudida rápida y probablemente estos efectos estén asociados al proceso de transformación de las fibras rápidas resistentes a la fatiga a fibras de sacudida rápida fatigables.**

## PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en esta fase experimental fue posible proponer que las deficiencias alimentarias perinatales provocan un incremento en la proporción de fibras de sacudida rápida resistentes a la fatiga y/o un aumento en la densidad de fibras musculares por área de sección transversal. Sin embargo, en la actualidad se cuenta con escasas evidencias experimentales que apoyen tales propuestas. Recientemente se ha reportado que las deficiencias alimentarias incrementan la capacidad oxidativa del músculo (Dauncey y cols., 1997), pero no comprometen su metabolismo glucolítico (Bissonnette y Jeejeebhoy, 1998), esto podría interpretarse como un incremento en la proporción de fibras rápidas resistentes a la fatiga en los músculos de animales alimentados con dietas deficientes. No obstante, esta hipótesis requiere ser fortalecida con observaciones a nivel histológico o de tipo inmunohistoquímico que muestren la predominancia de fibras de sacudida rápida resistentes a la fatiga en el músculo EDL de ratas desnutridas y malnutridas. En un corte histológico también se podría determinar el número y el diámetro de las fibras musculares presentes en los músculos (EDL y sóleo) de ratas control, desnutridas y malnutridas y utilizar esos datos para calcular la densidad de fibras por área de sección transversal de cada uno de los músculos estudiados.

Por otra parte, podría cuantificarse la cantidad total de proteínas contenidas en cada uno de los músculos bajo estudio, normalizando ésta en relación al peso muscular húmedo, como lo han efectuado diversos autores (por ejemplo, Russell y cols., 1984b), y también en relación al peso seco del músculo, ya que la cantidad de agua contenida dentro de las fibras musculares o en el líquido intersticial

podría ser diferente en los músculos de ratas control y alimentadas con dietas deficientes. La cantidad de agua contenida en el músculo modificaría la relación peso seco/peso húmedo (a menor contenido de agua, mayor valor de tal relación), de manera que nos permitiría establecer si el contenido de agua de los músculos de animales desnutridos y malnutridos varía en relación con la de los músculos control. Por otra parte podrían cuantificarse las proteínas totales contenidas en los músculos de animales control, desnutridos y malnutridos, normalizando los valores obtenidos tanto al peso húmedo como al peso seco (cantidad de proteína/gramo de peso húmedo o de peso seco), lo cual nos permitiría establecer con mayor claridad si las deficiencias alimentarias perinatales provocan un incremento en la concentración de proteínas por área de sección transversal o por gramo de músculo, sin que este valor sea enmascarado por el agua contenida en los músculos bajo estudio.

Finalmente, sería interesante determinar si la realimentación a partir del nacimiento o del destete, revierten los daños causados por la alimentación deficiente en calidad (malnutrición proteínica) o en cantidad (desnutrición) sobre las características contráctiles de los músculos EDL y sóleo.

## SEGUNDA PARTE

### ***“EFECTO DE LA DESNUTRICIÓN O LA MALNUTRICIÓN PERINATAL SOBRE LA GENERACIÓN Y TRANSMISIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN COMPUESTO GENERADOS EN NERVIOS SENSORIALES PERIFÉRICOS, DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DE LA RATA”.***

#### INTRODUCCIÓN

##### **Características morfológicas y electrofisiológicas de los nervios periféricos.**

Un nervio periférico está formado por un conjunto de axones de neuronas sensitivas y motoras cuya función es comunicar, mediante potenciales de acción, a los receptores sensoriales localizados en la piel, los músculos y las vísceras con la médula espinal.

Las características morfológicas y fisiológicas de los axones periféricos son muy variadas, por lo cual se han clasificado tomando en cuenta diversos criterios, tales como la estructura periférica que inervan, sus características histológicas o sus propiedades funcionales.

##### **Clasificación de los axones en un nervio periférico**

Considerando las estructuras que inervan sus axones, los nervios periféricos se han clasificado como:

**A) Nervios cutáneos o sensoriales**, cuyos axones (fibras aferentes) provienen de receptores situados en la piel o en las vísceras.

**B) Nervios musculares o motores**, cuyos axones provienen de receptores situados en los músculos, tales como los husos musculares (fibras aferentes Ia y II) y los órganos tendinosos de Golgi (fibras aferentes Ib), o en receptores



profundos (de presión). Los nervios motores contienen también axones eferentes que provienen de neuronas motoras  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de la médula espinal.

Desde el punto de vista histológico, los axones periféricos (cutáneos y motores) han sido clasificados en **fibras mielínicas** o **fibras amielínicas**, de acuerdo a la presencia o ausencia de vainas de mielina que circundan al axón nervioso, respectivamente. Además, las fibras mielínicas o amielínicas son de diverso diámetro, por lo que dicho parámetro también se ha utilizado como criterio para clasificar a los axones nerviosos (Willis y Coggeshall, 1978; Keynes y Aidley, 1985, Kandel, y cols. 1991. Ver tabla 1).

Es importante señalar que la nomenclatura utilizada para referirse a los diferentes tipos de fibras mielínicas y amielínicas varía en función del origen cutáneo o motor de las mismas. Así, Erlanger y Gasser (1937) y Bovie y Perl (1975) proponen una nomenclatura alfabética para referirse a las fibras cutáneas, mientras que Lloyd y Chang (1948), así como Stacey (1949) utilizan una nomenclatura numérica para clasificar a las fibras motoras (ver tabla 1). A continuación se describen los distintos tipos de axones, utilizando para ello la clasificación alfabética propuesta por Erlanger y Gasser en 1948. En cada caso, se indicará la correspondencia con la clasificación numérica de Lloyd y Chang (1948; también ver la tabla 1).

**Fibras del grupo A $\alpha$** , son fibras mielínicas "gruesas", cuyo diámetro varía de 13 a 20  $\mu\text{m}$ . Estas fibras provienen de husos musculares y órganos tendinosos de Golgi localizados en el músculo esquelético. Este tipo de fibras se encuentra

exclusivamente en los nervios motores. Son también conocidas como fibras del tipo I en la clasificación numérica propuesta por Lloyd y Chang (1948).

**Fibras del grupo A $\beta$** , son fibras mielínicas cuyo diámetro varía de entre 6 y 12  $\mu\text{m}$ . Proviene de receptores de tacto fino localizados en la piel y de receptores pilosos, así como de husos musculares secundarios. En la clasificación de fibras motoras se les denomina como fibras del grupo II.

**Fibras del grupo A $\delta$** , poseen un diámetro que varía de 1 a 5  $\mu\text{m}$ . Proviene de receptores a la temperatura, al tacto grueso y de presión profunda. También conducen el dolor punzante. En los nervios motores, estas fibras se denominan como del grupo III.

**Fibras del grupo C**, son fibras delgadas cuyo diámetro es menor de 1  $\mu\text{m}$  y no presentan mielina, conducen sensaciones de dolor, picazón, temperatura y tacto grueso. En los nervios motores son conocidas como fibras del grupo IV.

TABLA 1.- Clasificación de los axones que conforman un nervio periférico.

FIBRA CUTÁNEA	FIBRA MOTORA	DIÁMETRO	VEL. DE CONDUCC.	ESTRUCTURA INERVADA
GRUPO A $\alpha$	I	13-20 $\mu\text{m}$	72-120 m/s	músculo
GRUPO A $\beta$	II	6-12 $\mu\text{m}$	24-71 m/s	Piel, músculo
GRUPO A $\delta$	III	1-5 $\mu\text{m}$	6-23 m/s	piel
GRUPO C	IV	< 1 $\mu\text{m}$	0.5-5m/s	Piel, músculo

### **Propiedades electrofisiológicas de los axones nerviosos periféricos.**

Los axones de los nervios periféricos son elementos neuronales excitables, esto es, tienen la propiedad de generar y transmitir potenciales de acción por toda su longitud. Por ello, los axones nerviosos poseen diversas propiedades funcionales, algunas de las cuales se describirán a continuación:

**Umbral eléctrico de activación.-** Estrechamente relacionadas con sus características morfológicas, las fibras nerviosas de los grupos antes mencionados, presentan propiedades funcionales que las distinguen entre sí. Por ejemplo, el umbral eléctrico de activación de las fibras nerviosas varía en relación inversa con el diámetro de los axones, de manera que las fibras de los grupos  $A\alpha$  y  $A\beta$  tienen un umbral de activación considerablemente inferior (entre 10 y 20 veces menor) que el de las fibras C. Esta propiedad ha sido utilizada en diversos estudios experimentales para activar de manera selectiva a los distintos grupos de axones periféricos.

**Velocidad de conducción.-** Otra de las propiedades funcionales de las fibras nerviosas es la velocidad a la que conducen los potenciales de acción, la cual depende de: *A) grosor del axón*, debido a que las fibras nerviosas más gruesas presentan menor resistencia al flujo longitudinal de corriente, por lo cual la corriente iónica se desplaza más rápidamente a lo largo de una fibra gruesa que de otra de pequeño diámetro. *B) la presencia de vainas de mielina* alrededor del axón permite incrementar la velocidad de conducción del impulso nervioso (Waxman, 1977; Rogart y Ritchie, 1977; Wilson y Kitchener, 1996). Las fibras nerviosas mielínicas conducen el potencial de acción a mayor velocidad que las amielínicas debido a que la mielina actúa como un aislante eléctrico que impide la generación del potencial de acción en la membrana axonal que se encuentra por debajo de la región internodal, siendo los nodos de Ranvier los sitios en donde se pueden regenerar los impulsos nerviosos, de tal manera que el potencial de acción

se transmite en los axones "saltando" de un nodo de Ranvier a otro (Keynes y Aidley, 1985).

Se ha demostrado experimentalmente que los cambios de potencial registrados en la membrana nodal son el resultado de corrientes iónicas, principalmente de sodio y de potasio, tal y como ocurre en los axones amielínicos (Dodge y Frankenhaeuser, 1958, 1959) y que la velocidad de conducción en los axones mielínicos depende del grosor y del grado de compactación de las vainas de mielina, así como de la longitud del segmento internodal y de la amplitud del nodo, entre otras características (Waxman, 1977; Rogart y Ritchie, 1977; Wilson y Kitchener, 1996).

**Periodo refractario.-** La capacidad de los axones nerviosos para generar potenciales de acción a frecuencias relativamente altas depende en gran medida de la capacidad de los mismos para retornar a sus condiciones de membrana en reposo, después de ocurrido un potencial de acción. La repolarización de la membrana axonal se lleva a cabo mediante una bomba metabólica (dependiente de ATP), que incorpora potasio al interior de la fibra y extrae sodio de la misma (ver: Aidley, 1989). Una forma de establecer el grado de repolarización post-potencial en los axones es la determinación de los períodos refractarios absoluto y relativo, lo que a su vez ha sido considerado como una propiedad funcional de las fibras nerviosas.

**Cronaxia y reobase.-** El análisis de la relación entre la intensidad y la duración de un estímulo umbral aplicado a un nervio, permite conocer algunas de las propiedades activas y pasivas de los axones mielinizados, así como las alteraciones que éstas presentan cuando la mielinización es incompleta o nula



(Bostock, 1983). La relación entre la intensidad y la duración de un estímulo umbral es representada gráficamente por una función exponencial decreciente, que fue expresada por Lapicque (1907), con la ecuación 1,

$$I = I_{rb} / (1 - e^{-V_{tid}t}) \quad (1)$$

En donde:

$I$  es la intensidad de la corriente umbral, aplicada durante un tiempo  $t$ .

$I_{rb}$  es la corriente reobase, esto es, la intensidad de corriente que debe tener un estímulo de gran duración ( $t \rightarrow \infty$ ), para provocar un potencial de acción.

$t$  es la duración del estímulo.

$\tau_{id}$  es la constante de tiempo intensidad-duración.

Por otra parte Weiss (1901), logró transformar esta función en una línea recta sustituyendo la corriente por la carga. Para efectuar esta transformación Weiss utilizó la fórmula general:

$$I = dQ/dt$$

En donde:  $Q = \int I dt$ , cuando se estimula con una onda senoidal, o  $Q = I \Delta t$ , en caso de que la corriente de estimulación sea un pulso cuadrado. La ecuación propuesta por Weiss (1901), establece que la cantidad de cargas ( $Q$ ) que es necesario aplicar al axón para provocar un potencial de acción depende del tiempo de estimulación ( $t$ ) y de dos parámetros ( $a$  y  $b$ ), los cuales representan la ordenada al origen y la pendiente de la recta, respectivamente (Ec. 2).

$$Q = a + bt \quad (2)$$

Donde:

$Q$  es la carga umbral;

$t$  es la duración del estímulo;  
 $a$  y  $b$  son las constantes de la ecuación.

Sin embargo, debido a que en la época en que se propuso la ecuación de Weiss se desconocía la composición de las membranas excitables y aún no se habían propuesto los modelos eléctricos de las mismas, las constantes  $a$  y  $b$  no pudieron asociarse a ninguno de los elementos presentes en las membranas excitables.

Posteriormente, Bostock (1983) propuso una ecuación (Ec. 3) para establecer la relación existente entre los parámetros de la ecuación de Weiss (Ec. 2) con las características de los elementos presentes en las membranas de los axones mielínicos. Este autor mostró que la corriente reobase ( $I_{rb}$ ) es proporcional a la conductancia de entrada de la fibra. Esto significa que el valor de la reobase depende del incremento inicial en la conductancia al sodio provocada por la aplicación de una corriente despolarizante.

$$Q = I_{rb} (t + \tau_{id}) \quad 3$$

En donde:

$Q$  es la cantidad de cargas que hay que aplicar al axón mielinizado para provocar un potencial de acción.

$I_{rb}$  corresponde al valor de la corriente reobase, y físicamente representa a la cantidad de cargas por unidad de tiempo que activan la generación de un potencial de acción,

$\tau_{id}$  es la constante de tiempo. Gráficamente corresponde al punto de intersección de la recta con el eje de tiempo.

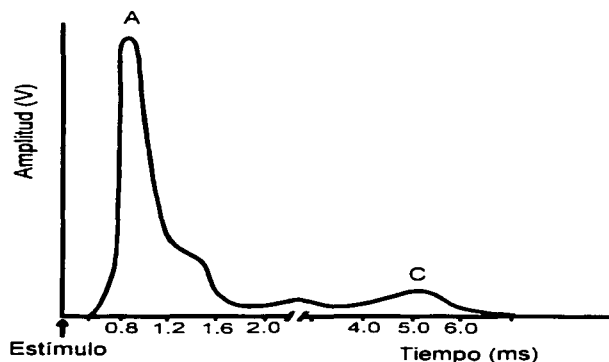
$t$  es la duración del estímulo.

Utilizando la ecuación 3, es factible conocer la corriente reobase y la constante de tiempo, a partir de los valores de la pendiente y del intercepto de la recta con el eje de tiempo, mediante una regresión simple.

### **Actividad eléctrica de los nervios periféricos**

La respuesta eléctrica de un nervio, producida por estímulos de intensidad supraumbral, se denomina **potencial de acción compuesto (PAC)**, y es el resultado de la suma de los potenciales de acción generados en cada una de las fibras que constituyen al nervio. Debido a la presencia de fibras nerviosas con diferente umbral de excitación eléctrica y con distinta velocidad de conducción, el registro del PAC de un nervio periférico puede presentar varios componentes. Así, durante el registro del PAC en un nervio sensitivo es factible observar dos componentes: el primero (**componente A**), resulta de la activación de axones con bajo umbral de excitación y posee una latencia de aparición muy breve (Fig. 1). En cambio, el segundo componente (**componente C**), es provocado probablemente por la activación de fibras mielínicas de alto umbral ( $A\delta$ ) o por fibras amielínicas, por lo que solo se registra cuando el axón es estimulado con pulsos de corriente aproximadamente 10 veces mayor que la requerida para activar las fibras más excitables del primer componente. El componente C presenta una mayor latencia

de aparición, ya que la velocidad de conducción de las fibras A $\delta$  o C, es considerablemente menor que la de las fibras A (Fig. 1).



*Figura 1.-Representación esquemática de los componentes A (1A) y C (1B) del potencial de acción compuesto registrado en un nervio sensitivo (Modificado de Kandel y cols., 1997).*

### **Desarrollo ontogénico de los nervios periféricos.**

**Desarrollo del axón: Características generales.** Las neuronas son células altamente polarizadas, tanto estructural como funcionalmente. La polaridad se refleja principalmente por las diferencias morfológicas entre el axón y las dendritas, por ejemplo algunos organelos celulares, como los ribosomas y los elementos de Golgi, se encuentran presentes en las dendritas pero no en los axones (Jacobson, 1993). El citoesqueleto también presenta polaridad en su organización ya que se ha encontrado que el extremo grueso de los microtúbulos se encuentra orientado hacia la región de crecimiento axonal, mientras que el

extremo más angosto se ubica en el centro del cuerpo celular (Burton y Paige, 1981; Heideman y cols., 1981). La distribución de las especializaciones pre-, y post-sinápticas, que determina la dirección del tráfico de impulsos nerviosos, es otra manifestación de la polaridad neuronal.

Durante su diferenciación y crecimiento la región correspondiente al axón se alarga en una dirección específica desde el soma hasta establecer contactos sinápticos con los blancos adecuados (Jacobson y Huang, 1985). El crecimiento de los axones hacia sus blancos se inicia gracias a la tendencia intrínseca de alargamiento que presenta una región de las neuronas jóvenes llamada **cono de crecimiento**, el cual interactúa con numerosos factores del medio ambiente que tienen como función la de promover o inhibir el crecimiento del axón.

El cono de crecimiento puede ser estimulado por moléculas, tales como factores de crecimiento que se transportan por difusión a través del medio extracelular y que forman un gradiente de concentración, con un pico cerca del órgano blanco. Aparentemente el cono de crecimiento contiene receptores para esas moléculas, las cuales poseen la capacidad de estimular el crecimiento y modificar la dirección del axón en desarrollo (Munro y Crick, 1971). Además las células localizadas en la vía de crecimiento del axón e incluso las células blanco, producen factores de crecimiento que interactúan con el cono de crecimiento axónico, acelerando o inhibiendo el alargamiento del axón (Munro y Crick, 1971; Jacobson, 1993).

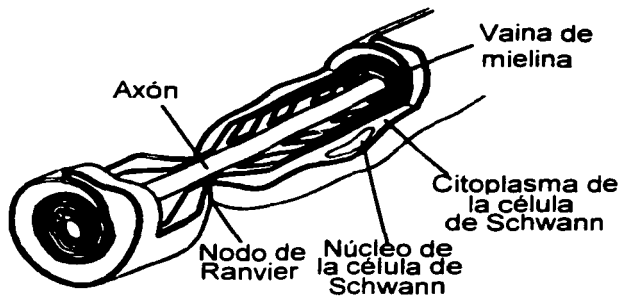
Por otra parte, la matriz extracelular puede ser modificada mediante enzimas producidas por el cono de crecimiento (Jacobson, 1993) e incluso las actividades de ciertos grupos celulares, como las células de Schwann, que rodean

a todos los axones periféricos, dependen de su interacción con el axón en crecimiento, ya que se ha reportado que la mitosis de estas células se efectúa únicamente durante el proceso de crecimiento del axón (Wood y Bunge, 1975).

### **Mielina: generalidades y ontogenia**

La mielina es una membrana constituida por una bicapa de lípidos, que a diferencia de otras membranas, contiene muy pocas proteínas. La mielina que rodea a cada uno de los axones mielinizados se encuentra formada por células gliales individuales, separadas una de otra por un área sin mielina llamada nodo de Ranvier. La vaina de mielina, puede recubrir a los axones con 50 a 100 capas o lamelas, actuando como un aislante eléctrico que impide la transferencia de iones a través de la membrana axonal. Los nodos de Ranvier son los únicos sitios de la membrana axonal que están directamente en contacto con el líquido extracelular (Fig. 2).

En el sistema nervioso periférico la vaina de mielina es formada por las células de Schwann. Durante su desarrollo ontogénico, las células de Schwann derivan de la cresta neural (Detwiler y Kehoe, 1939), de donde migran hacia los nervios periféricos (Billings-Gagliard y cols., 1974; Billings-Gagliard, 1977), ya en contacto con los axones nerviosos las células de Schwann empiezan a proliferar, probablemente debido a que interactúan con sustancias producidas por el axón durante su crecimiento (Lubinska, 1961; Salzer y cols., 1980; Ratner y cols., 1984).



*Fig.2. Sección longitudinal de un axón mielinizado, puede observarse la vaina de mielina rodeando al axón, así como el citoplasma y el núcleo de la célula de Schwann. También se aprecia un segmento sin mielina, el nodo de Ranvier (Tomada de Guyton y Hall, 2001).*

La longitud inicial de todos los segmentos internodales en los axones mielinizados es constante (de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ ). Durante el crecimiento del animal, el número de segmentos internodales no cambia; pero la longitud internodal se incrementa a medida que el nervio se alarga (Friede, 1973; Friede y cols., 1985).

En las fases iniciales del proceso de mielinización, la célula de Schwann rodea al axón dejando un canal (el mesaxón), abierto hacia el espacio extracelular (Jacobson, 1993). Entonces una prolongación de la célula de Schwann, semejante a una lengüeta, rodea al axón formando una espiral. Finalmente durante la compactación de la membrana de la célula de Schwann que rodea al axón, el citoplasma es expulsado de la porción internodal, quedando solamente dos collares de citoplasma, uno interno cerca del axón y otro externo en la cercanía del nodo de Ranvier (Jacobson, 1993). Antes de la formación de las lamelas de

mielina, hay un período en el cual se incrementa considerablemente la síntesis de lípidos en la célula de Schwann (Benjamin y Smith, 1984)

Desde el punto de vista fisiológico, se ha reportado un incremento gradual en la velocidad de conducción del potencial de acción compuesto, registrado en el nervio ciático de la rata, durante la primera semana de vida postnatal que se ha asociado con la formación de la vaina de mielina (Vabnick y Shrager, 1998). Sin embargo, el aumento en la velocidad de conducción de los axones depende también de las características intrínsecas de la misma vaina de mielina, por ejemplo, se ha reportado que mientras mayor es el grado de compactación de las lamelas de mielina es mayor la velocidad a la que se conduce el impulso nervioso (Gutierrez y cols, 1995), y que existe una dependencia directa entre la velocidad de conducción del potencial de acción y la longitud del internodo (a mayor longitud internodal, mayor es la velocidad de conducción).

### **ANTECEDENTES**

En la actualidad se cuenta con una inmensa cantidad de evidencias que indican las alteraciones que provoca la desnutrición sobre el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC; ver: Morgane y cols., 1978, Morgane y cols., 1992, Morgane y cols., 1993). En cambio, se cuenta con una información muy escasa del posible efecto que produce una alimentación perinatal deficiente en calidad o cantidad, sobre el desarrollo postnatal del Sistema Nervioso Periférico (SNP).

Krigman y Hogan en 1976 reportan que el SNC de animales sometidos a desnutrición durante la etapa post-natal, presenta un retraso en el inicio de la



mielinización. Posteriormente, Robain y Ponsot (1978), y Lai y Lewis (1980) observan un retraso en el proceso de diferenciación de la oligodendroglia cerebral. Por otra parte, Delaney y colaboradores (1981) reportan que la privación neonatal de alimento retrasa el proceso de mielinización en el tracto piramidal de la rata. Lo anterior coincide con las observaciones realizadas por Lai y Lewis (1980) en el cuerpo caloso de la rata. Asimismo, Lai y Lewis (1980) y Delaney y colaboradores (1981) muestran que la privación neonatal de alimento produce una disminución en el número de lamelas que rodean a los axones mielinizados de algunas áreas del cerebro y de la médula espinal de la rata.

En cuanto al SNP, Clos y Legrand (1970) y Hedley-White y Meuser (1971) reportan que la restricción de alimento en la etapa postnatal reduce el grosor de la vaina de mielina en fibras del nervio ciático, lo cual podría indicar que el proceso de mielinización es alterado por la desnutrición.

Por otra parte, Sima (1974a) reporta una notoria reducción en el diámetro de los axones del nervio ciático de crías neonatales, cuyas madres fueron alimentadas durante los períodos de gestación y lactancia con la mitad del alimento proporcionado a los animales control. Este mismo autor (Sima, 1974 b) observó en ratas de 90 días, sometidas a desnutrición durante las etapas de gestación y lactancia, que las fibras nerviosas de las raíces dorsales y ventrales mostraban una disminución en su circunferencia y en el número de lamelas de mielina. Sin embargo, los efectos de la desnutrición eran revertidos parcialmente en las raíces ventrales, pero no en las raíces dorsales, si los animales eran sometidos a una dieta normal de alimento (en cantidad y calidad) a partir del día cero post-natal. La evidencia anterior, sugiere que la desnutrición producida

durante los periodos de gestación y lactancia (desnutrición perinatal) provoca daños irreversibles en las fibras aferentes, mientras que las fibras eferentes o motoras presentan alteraciones que son parcialmente reversibles, en el caso de someter a los animales a un período de realimentación.

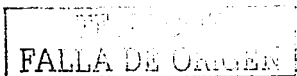
Desde el punto de vista electrofisiológico se ha reportado, que en la rata normal, es posible registrar los componentes de bajo umbral (componente A) y de alto umbral (componente C), desde el día del nacimiento (día cero postnatal), pero la cantidad de fibras que responden a la estimulación, así como la velocidad a la que se conduce el potencial de acción son reducidas a edades tempranas y se incrementan a medida que el animal crece (Fitzgerald, 1985).

Como puede observarse, existe una cantidad muy limitada de información acerca de los efectos que producen la desnutrición y la malnutrición perinatales sobre las características histológicas de los axones y de las células de Schwann, y se carece por completo de evidencias experimentales, de índole electrofisiológico, sobre las alteraciones que producen la desnutrición y la malnutrición perinatales en la generación y en la transmisión del impulso nervioso en axones de nervios periféricos.

### **HIPÓTESIS**

La malnutrición proteínica (caseína 6%) y la desnutrición (50% de alimento) provocarán alteraciones sobre las características morfológicas y sobre las propiedades electrofisiológicas de los nervios periféricos de la rata en desarrollo.

Para probar la hipótesis anterior, en la segunda sección del presente estudio se han planteado como objetivos experimentales, los siguientes:



### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto que producen la desnutrición (50% de alimento) y la malnutrición proteínica (caseína 6%) perinatales sobre las propiedades funcionales del potencial de acción compuesto (PAC) del nervio sural de ratas en desarrollo.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- A) Determinar el efecto que producen la desnutrición (50% de alimento) y la malnutrición proteínica sobre el umbral del potencial de acción compuesto generado en axones mielínicos y amielínicos de nervios cutáneos de animales en desarrollo.
- B) Establecer las posibles alteraciones que producen la desnutrición 50% de alimento) y la malnutrición proteínica sobre la velocidad de conducción de las fibras mielínicas y amielínicas de nervios cutáneos en desarrollo.
- C) Establecer las posibles alteraciones que provoca la desnutrición 50% de alimento) y la malnutrición proteínica sobre el post-potencial repolarizante (período refractario absoluto) de las fibras aferentes mielinizadas del nervio sural de ratas en desarrollo.
- D) Determinar el efecto de la desnutrición 50% de alimento) y la malnutrición proteínica sobre las características morfométricas de los axones del nervio sural durante el desarrollo postnatal de la rata.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

De igual manera que los experimentos realizados en la primera sección de esta tesis, los experimentos que comprenden esta segunda parte fueron realizados en el Laboratorio 11 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional a cargo del Dr. Ismael Jiménez Estrada.

### **Método de desnutrición y malnutrición:**

Los experimentos correspondientes a esta sección se llevaron a cabo en nervios surales de crías de la rata, variedad Wistar con distintas edades postnatales. Los animales fueron obtenidos al colocar tres grupos de ratas hembra, con un peso inicial de 250 g, bajo regímenes de alimentación diferentes desde tres semanas previas al apareamiento y durante el periodo peri-natal, tal y como se describen en la sección de métodos de la primera parte de este estudio. Cabe señalar que los experimentos de esta serie también fueron realizados obedeciendo las normas éticas señaladas en la guía de los Institutos Nacionales de Salud (NIH Publications No. 8023), para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

### **Registro del potencial de acción compuesto.**

En la presente serie de experimentos, decidimos utilizar el nervio sural de los animales en desarrollo, debido a que este está formado principalmente por axones sensitivos (sin embargo, veanse Harrison, 1975; Liguori y Trojaborg, 1990, Nakanishi y Forbes, 1970), además de ser de fácil acceso para su disección (Fig. 3.A; vease Popesko, y cols., 1990). Los registros del Potencial de Acción



Compuesto (PAC) fueron efectuados en el nervio sural de las extremidades posteriores de ratas macho control, desnutridas y malnutridas, cuyas edades fueron de 8, 12, 16, 18, 25, 30, 60 y 90 días postnatales. Al principio del experimento, los animales fueron pesados y posteriormente anestesiados con hidrato de cloral (400 mg/Kg de peso; Laboratorios Monterrey S.A.). Los nervios sural de ambas extremidades fueron disecados y colocados en una cámara de registro con solución Krebs (NaCl 128, KCl 3,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{CaCl}_2$  1.5,  $\text{MgSO}_4$  1,  $\text{NaHCO}_3$  21, Glucosa 30 mM; Baker) a temperatura ambiente. Al final de la disección, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

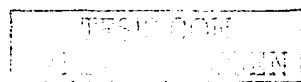
Para la estimulación del nervio, se introdujo a uno de sus extremos (por lo general el distal) en una micropipeta de succión, la cual contenía un alambre de plata clorurada en su interior y un alambre de plata con aislante que la rodeaba en su exterior (excepto en la punta; Fig. M1), los cuales fueron conectados a un generador Digitimer tipo 3290, con el que se aplicaron pulsos de corriente de amplitud y duración controlados. El registro del potencial de acción compuesto se efectuó mediante otra micropipeta de succión (Stys y cols., 1991), conectada a un amplificador de alta ganancia Grass modelo p711 (con los filtros pasa bajos mantenidos en 0.3 Hz y pasa altos a 10 KHz), el cual a su vez se conectó a un osciloscopio Tektronix, modelo D13 (Fig. M1) y a una computadora (interfase National Instruments, modelo BNC 2090), donde se almacenaron los datos para su posterior análisis.

La resistencia de los electrodos de registro y de estimulación ( $R_p$ ) fue determinada al medir la caída de voltaje que ocurría al pasar un pulso de voltaje constante (1-2 V, 5 ms) a través de los electrodos con el nervio insertado en ellos

(Stys y cols., 1991, 1993; Stys y Kocsis, 1995). El sistema de registro era previamente calibrado al pasar el mismo pulso de voltaje a través de una resistencia eléctrica de 10 M $\Omega$ . Se realizó un esfuerzo particular para obtener electrodos, con los nervios insertados, con resistencias ( $R_p=8-10$  k $\Omega$ ) que fuesen semejantes en todos los experimentos, independientemente del diámetro del nervio.

En todos los experimentos, el PAC fue generado mediante la aplicación de pulsos únicos de corriente, con una duración de 0.05 ms y de intensidad graduada. Se estableció el umbral eléctrico ( $1 \times T$ ) de los nervios como la corriente eléctrica mínima necesaria para activar las fibras más excitables del nervio. La relación intensidad-duración del estímulo se obtuvo al determinar la intensidad de corriente necesaria para producir una respuesta apenas discernible en el nervio, pero utilizando pulsos con distintas duraciones (de 0.05 a 1 ms). El valor reobase correspondiente a cada nervio fue calculado a partir de la cantidad de carga eléctrica empleada por unidad de tiempo ( $dQ/dt$ ), que se obtuvo de las curvas intensidad-duración del estímulo (ver: Noble y Stein, 1966; Aidley, 1989). La corriente eléctrica de estimulación se determinó a partir de la caída del voltaje observada a través de una resistencia eléctrica de 1000  $\Omega$ , colocada en el retorno a tierra del sistema de registro (Fig. M1).

La respuesta máxima de cada uno de los componentes del PAC provocado en los nervios surales fue obtenida al incrementar gradualmente la intensidad del estímulo, con múltiplos de la intensidad umbral, esto es, las fibras aferentes mielínicas fueron activadas con estímulos únicos de 0.05 ms de duración e



intensidad dos o tres veces la necesaria para activar las fibras nerviosas más excitables (componente A: 2-3xT; Fig. R1A), mientras que las fibras amielínicas fueron activadas por pulsos de mucha mayor intensidad (componente C: 20-30xT; Fig. R1B). Asimismo, se estableció el período refractario absoluto de cada uno de los nervios como el intervalo de tiempo entre dos estímulos consecutivos (de intensidad supraumbral), en el que el segundo estímulo fuese incapaz de generar respuesta alguna en el nervio. Las condiciones de estimulación y/o registro fueron valoradas rutinariamente a lo largo de los experimentos al monitorear la amplitud máxima y el umbral del PAC. En el caso de que se presentase una variación del 10% o mayor en la amplitud o en el umbral del PAC, se descartaba la observación en su totalidad.

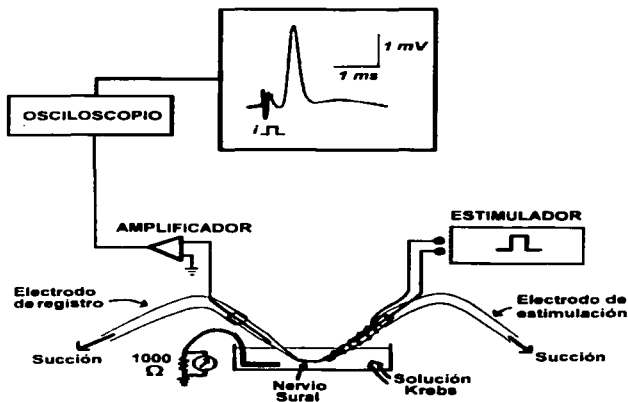


Figura. M1.- Arreglo experimental utilizado para provocar y registrar el potencial de acción compuesto en el nervio sural de la rata.

### **Procesamiento de datos.**

Los potenciales registrados fueron almacenados en video-cintas y posteriormente al experimento, fueron promediados ( $n=16$  muestras obtenidas a 1 Hz de frecuencia), integrados y almacenados digitalmente utilizando un programa de computadora, elaborado ex profeso para ello en el laboratorio (Programa en ambiente LabView 5.0, elaborado por Porfirio Reyes y Enrique Velázquez). Posteriormente al experimento, se midió la amplitud y el área de cada uno de los componentes (A y C) del PAC promedio y se calculó la velocidad de conducción máxima del PAC al dividir la longitud del nervio con el intervalo de tiempo que ocurría entre el artefacto del estímulo y el comienzo del potencial registrado.

### **Histología.**

En una serie adicional de experimentos, en los cuales se utilizaron nervios surales de ratas control y desnutridas de 30 y 90 días de edad ( $n= 4$  por paradigma experimental), los cuales fueron seccionados transversalmente, de tal manera que se obtuvieran 2 segmentos, uno que fue utilizado para el análisis histológico y el otro para el registro electrofisiológico del PAC. Muestras de cada uno de los segmentos (de 2 a 3 mm de largo) fueron fijados en solución de Karnovsky (constituída por: paraformaldehído, 1%; glutaraldehído, 2.5% y cacodilato de sodio 0.2 M, pH: 7.5; Karnovsky, 1965), lavados con una solución amortiguadora de cacodilato de sodio (pH: 7.4-7.6) y post-fijadas en frío con tetróxido de osmio (1%). Las muestras fueron deshidratadas al pasarlas por varias soluciones de etanol (70, 80, 90, 95, 100%) y embebidas en resina EPON 812. Las muestras fueron cortadas transversalmente en secciones finas de 1-2  $\mu\text{m}$  de



grosor y teñidas con azul de toluidina (diluida en una solución 0.5% en 4% de borato de sodio). Uno de los cortes fue seleccionado y fotografiado. La fotografía resultante fue ampliada en varias ocasiones (mediante procesos de fotocopiado), hasta que se permitiera la determinación del número, el área y el grosor de la vaina de mielina en los axones de los nervios. El área de los axones fue determinada individualmente con un planímetro y el grosor de la vaina de mielina se midió con un vernier calibrado.

#### **Análisis estadístico.**

Para comparar los valores obtenidos en cada uno de los parámetros medidos en el PAC de los nervios control, desnutridos y malnutridos, los resultados fueron analizados mediante la prueba estadística de ANOVA de una vía (simple) y posteriormente por la prueba de Tukey. Los datos ilustrados en las tablas y en las figuras son los valores promedio ( $\pm$ E.E.) obtenidos de 8 a 10 nervios.

## **RESULTADOS**

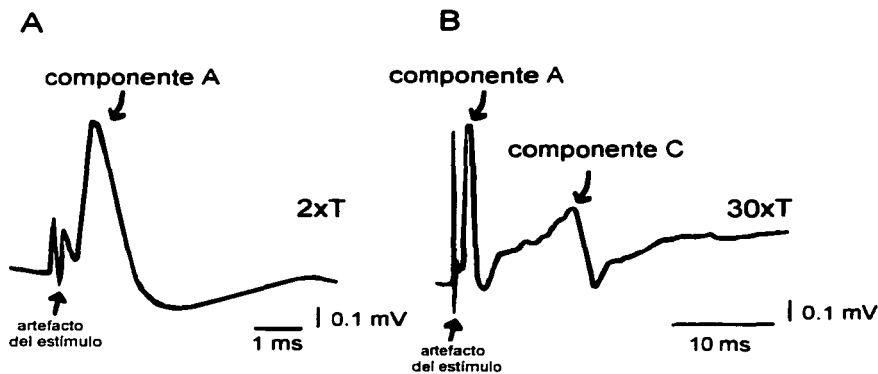
### **Efecto de la desnutrición o malnutrición perinatales sobre el peso corporal.**

Al igual que los animales empleados en la primera parte de esta tesis, las ratas sometidas a desnutrición o a malnutrición perinatales disminuyen considerablemente su peso corporal con respecto al de las ratas control (Tabla R1), en todas las edades registradas (ANOVA simple, seguida de la prueba de Tukey;  $p < 0.005$ ). Estos resultados concuerdan notablemente con los reportados en diversos estudios, en los que se han empleado diferentes procedimientos de desnutrición (Morgane, y cols.1978; Morgane y cols., 1992; Morgane y cols. 1993, Segura, 1993).

### **Efecto de la desnutrición o malnutrición perinatal sobre el Potencial de Acción Compuesto (PAC).**

La aplicación de pulsos únicos de voltaje en un extremo de los nervios surales provocaron la excitación de los axones, y en consecuencia la generación del PAC, el cual fue registrado en el otro extremo del nervio. Tanto la magnitud como el número de componentes que se registran en el PAC depende en gran medida de la cantidad (número) y de las propiedades electrofisiológicas de las fibras nerviosas excitadas (por ejemplo: del umbral de activación y/o de la velocidad de conducción del impulso nervioso). La figura R1 muestra registros típicos del PAC provocado en el nervio sural de una rata control de 30 días de nacida. Las respuestas fueron generadas por estímulos simples independientes, pero de distinta intensidad. Con estímulos de pequeña intensidad (2-3xT; Fig. R1A) es factible generar un componente temprano en el PAC, cuya latencia al

inicio es de aproximadamente 0.1 ms. Es ampliamente aceptado que este componente resulta de la activación de fibras aferentes de tipo A $\alpha$  o A $\beta$ , de bajo umbral de activación y gran velocidad de conducción del potencial de acción (componente A; ver: Patton, 1965; Rogart y Ritchie, 1977). Al incrementar notoriamente la intensidad del estímulo (hasta 30XT; Fig. R1B) es posible observar la aparición de un segundo componente (denominado en este estudio como componente C), que presenta una latencia de aparición que es notoriamente mayor que la del componente A (aproximadamente 8 ms; Fig. R1B) y que al parecer resulta de la excitación de fibras A $\delta$  o C, las cuales poseen alto umbral de activación y baja velocidad de conducción (Patton, 1965; Rogart y Ritchie, 1977).



*Figura R1. Componentes del PAC, registrados en el nervio sural de una rata control de 30 días de edad postnatal. (A) La estimulación con pulsos de corriente de baja intensidad (2XT) provoca la aparición de un componente de latencia breve (~0.6 ms; componente A), asociado a la activación de las fibras aferentes del grupo A. (B) Una corriente de alta intensidad (30XT) provoca un potencial de latencia más larga (componente C), que probablemente es debido a la excitación de las fibras A $\delta$  o C.*

### **Amplitud y área del PAC.**

Para obtener la respuesta máxima de los nervios bajo estudio, se empleó un protocolo de estimulación en el que se utilizó una secuencia de pulsos individuales pero de intensidad creciente, tal y como se ilustra en los registros mostrados en la figura R2A y C. En esta figura se puede apreciar que el PAC provocado en segmentos de nervios surales controles y desnutridos, de crías con 30 y 90 días de edad, fue aumentando gradualmente de amplitud (Fig. R2A y C) y área (Fig. R2B y D) a medida que se incrementaba la intensidad del estímulo. Esto indica que a medida que se incrementa la intensidad del estímulo se van excitando axones, con distinto umbral de activación, cuyos potenciales de acción individuales se van reclutando gradualmente al PAC.

Este procedimiento fue empleado en todos los experimentos para obtener el PAC de máxima amplitud y área generado en nervios de animales control y experimentales y con diferentes edades postnatales.

La figura R3 muestra el efecto que produce la desnutrición o la malnutrición perinatal sobre la amplitud máxima y el área de los componentes A y C del PAC, generado en animales con distintas edades postnatales.

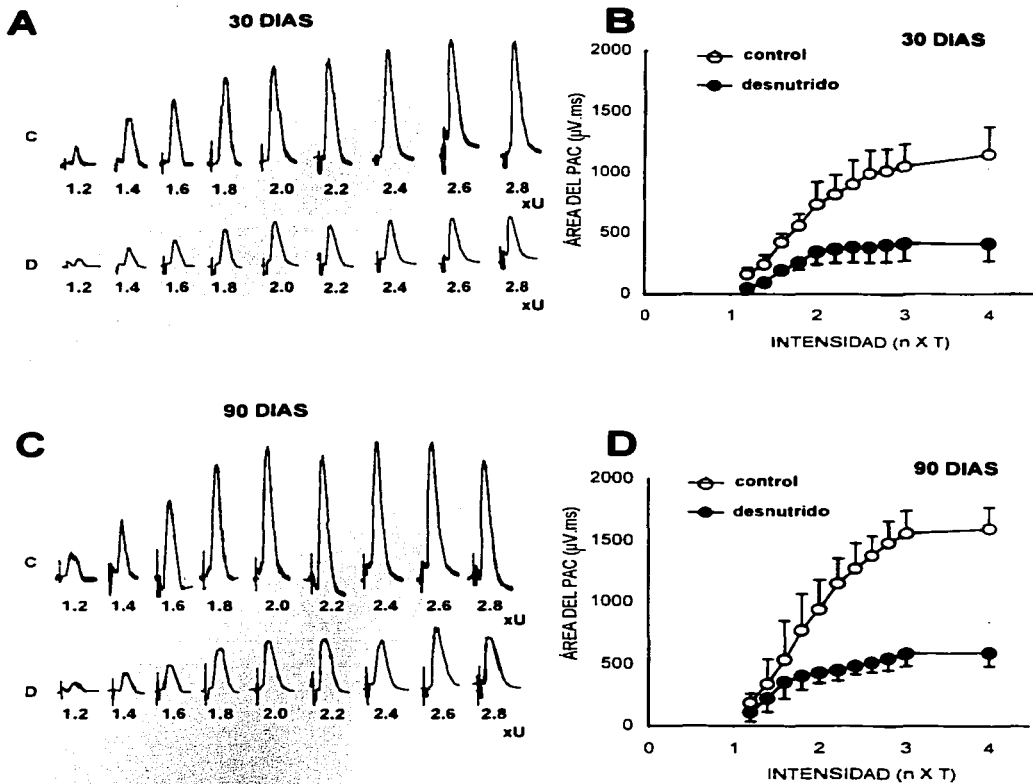


Figura R2. La estimulación con corrientes de intensidad creciente, aumenta significativamente la amplitud y el área del PAC registrado en el nervio sural de ratas control de 30 (A y B, círculos vacíos) y 90 días (C y D, círculos vacíos) de edad, pero no en el mismo nervio de ratas desnutridas de 30 (A y B, círculos llenos) y 90 días (C y D, círculos llenos).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

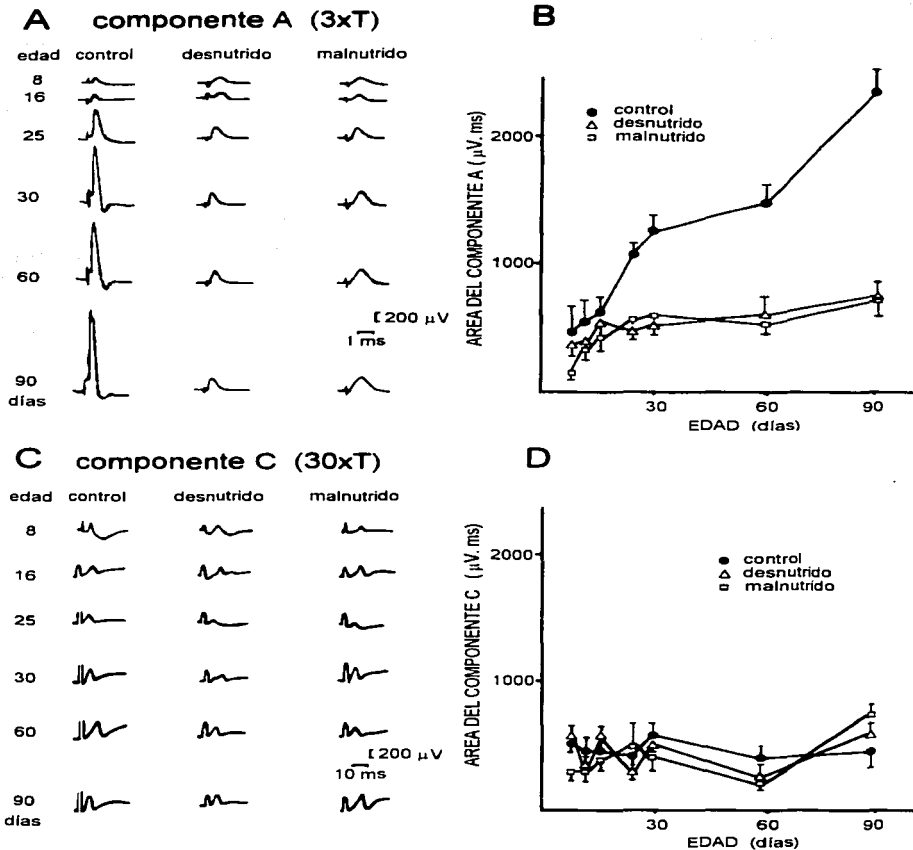


Figura R3. Efecto de la desnutrición y la malnutrición sobre el desarrollo postnatal de PAC provocado en el nervio sural. Trazos A y C: registros promedio ( $n=16$ ) de los componentes A y C del PAC, provocados por la aplicación de corrientes con intensidad tres y treinta veces umbral respectivamente, al nervio sural de ratas control, desnutridas y malnutridas. B y D: Gráficas que ilustran el área de los componentes A y C del PAC respectivamente (El número de nervios empleados por edad y paradigma alimentario se señala en la tabla R1).

En nuestros experimentos observamos que entre los 8 y los 16 días de edad post-natal se presentaba una notable similitud en la amplitud del componente rápido del PAC en los tres grupos de animales (Fig. R3A). El área del potencial de los nervios desnutridos y malnutridos no difería significativamente del potencial registrado en nervios control (ANOVA simple  $p > 0.05$ ; Fig. R3B; Tabla R1).

Conviene señalar que a partir de los 25 días hasta los 90 días postnatales, el componente A provocado en nervios control aumenta exponencialmente de amplitud y área (Fig. R3A y B; Tabla R1), lo cual podría indicar que la excitabilidad de los axones en los nervios se va incrementando paulatinamente de acuerdo a la edad de los animales. En contraste, el mismo componente pero registrado en los nervios de animales desnutridos o malnutridos no muestra incrementos notables de amplitud (Fig. R3A) o área (Fig. R3B; Tabla R1) durante el desarrollo postnatal de los animales y fue significativamente de menor amplitud y área (entre 50 y 300% menor) que el componente A del PAC registrado en nervios control (ANOVA,  $p < 0.001$ ; Tabla R1).

Por otra parte, tanto la amplitud como el área del componente C del PAC provocado en nervios control no mostraron diferencias significativas con los mismos parámetros del PAC registrado en nervios de animales desnutridos o malnutridos, en todas las edades postnatales analizadas (Fig. R3C y D; Tabla R3). Las observaciones anteriores nos permiten sugerir que el número de axones activados en los nervios desnutridos o malnutridos es sensiblemente menor que el número de axones excitados en los nervios control. Lo que contrasta con la aparente activación de un número similar de axones A $\delta$  o C, tanto en nervios

control como experimentales. Lo anterior, podría explicarse si se considera que la desnutrición o la malnutrición perinatales inducen un incremento importante en el umbral de activación (disminución de la excitabilidad) de las fibras mielinizadas del grupo A $\alpha$  o A $\beta$  o bien, provocan una reducción en el número de fibras presentes en el nervio periférico, ya sea por muerte axonal o por bloqueo en la transmisión del impulso nervioso (vease más adelante).

Tabla R1. Propiedades electrofisiológicas del componente A del potencial de acción compuesto (PAC) generado en nervios surales de crías control (C), desnutridas (D) y malnutridas (M) con diferentes edades postnatales.

Edad (días)	Peso corporal (g)			Área del PAC ( $\mu$ V.ms)			Velocidad de conducción (m/s)		
	C	D	M	C	D	M	C	D	M
8	21.6 $\pm 0.5$ (10)	11.3 $\pm 0.3$ (12)***	8.2 $\pm 0.4$ (8)***	453.5 $\pm 192$ (8)	358.9 $\pm 75.1$ (8)	153.9 $\pm 25.3$ (8)	6.1 $\pm 0.6$ (9)	3.9 $\pm 0.4$ (8)*	4.7 $\pm 0.6$ (8)
12	28.6 $\pm 1.0$ (14)	14.1 $\pm 0.5$ (10)***	11.0 $\pm 0.4$ (10)***	502.3 $\pm 127$ (9)	375.9 $\pm 80.1$ (10)	339.2 $\pm 38.6$ (9)	10.4 $\pm 0.7$ (10)	9.5 $\pm 3.1$ (10)	8.9 $\pm 1.0$ (9)
16	41.8 $\pm 0.6$ (16)	17.5 $\pm 0.7$ (14)***	13.6 $\pm 0.4$ (14)***	609.8 $\pm 60.1$ (8)	531.8 $\pm 114$ (8)	429.6 $\pm 125$ (10)**	14.9 $\pm 0.9$ (10)	12.3 $\pm 0.7$ (10)	11.4 $\pm 1.1$ (10)*
25	58.9 $\pm 1.3$ (11)	21.9 $\pm 1.2$ (9)***	23.1 $\pm 1.1$ (9)***	1085 $\pm 52.6$ (10)	466.7 $\pm 23.9$ (9)***	501.7 $\pm 38.9$ (9)***	19.4 $\pm 1.8$ (10)	14.3 $\pm 1.8$ (10)*	18.7 $\pm 1.4$ (9)
30	111.6 $\pm 3.2$ (14)	32.0 $\pm 1.7$ (14)***	21.1 $\pm 1.1$ (14)***	1261 $\pm 117$ (10)	496.8 $\pm 60.7$ (9)***	514.6 $\pm 102$ (10)***	18.7 $\pm 0.8$ (10)	14.6 $\pm 0.7$ (10)**	18.7 $\pm 1.0$ (10)
60	285.4 $\pm 6.0$ (11)	118.2 $\pm 4.9$ (9)***	32.9 $\pm 7.0$ (9)***	1462 $\pm 144$ (9)	607.9 $\pm 149$ (10)***	508.1 $\pm 72.2$ (9)***	32.5 $\pm 2.1$ (10)	26.5 $\pm 2.1$ (9)***	22.4 $\pm 2.5$ (10)**
90	410.8 $\pm 8.0$ (10)	150.1 $\pm 9.6$ (10)***	49.7 $\pm 2.6$ (10)***	2313 $\pm 206$ (10)	751.1 $\pm 105$ (10)***	733.5 $\pm 164$ (10)***	35.5 $\pm 1.2$ (10)	35.5 $\pm 2.2$ (10)	28.4 $\pm 5.1$ (10)

Se indican valores promedio  $\pm$  error estándar del peso corporal, así como del área y la velocidad de conducción de las fibras más rápidas en el nervio sural que generan el componente A del PAC. Entre paréntesis se muestra el número de nervios empleados por edad y paradigma alimentario. Los asteriscos indican los rangos de confianza para las diferencias estadísticas entre los procedimientos control y experimentales (pruebas de ANOVA simple seguida de la prueba de Tukey: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).



### **Umbral eléctrico de activación.**

Para explicar la pequeña amplitud y área del componente A del PAC de los nervios sural desnutridos y malnutridos, podría suponerse que las fibras aferentes sufrieron una reducción en su excitabilidad, la que a su vez estaría asociada a un incremento en el umbral de activación de los axones sensoriales. Esta posibilidad fue analizada en el presente trabajo al determinar el umbral eléctrico de activación y el valor reobase de las fibras nerviosas más excitables de los nervios control y experimentales.

La figura R4A y Tabla R2 muestran los valores promedio de la cantidad de corriente de estimulación necesaria para activar las fibras más excitables de los nervios sural provenientes de animales control, desnutridos y malnutridos, con distintas edades postnatales. Como se puede observar en la figura R4A, en el día 8 postnatal fue necesario aplicar mayor cantidad de corriente de estimulación (entre 2 y 3 veces más) para provocar la mínima respuesta en los nervios desnutridos que la utilizada para activar las fibras de los nervios control y malnutridos (Tabla R2).

Sin embargo, a partir del día 12 postnatal el umbral de activación disminuyó considerablemente tanto en los animales control como en los experimentales, adquiriendo valores muy semejantes a los que se observan en nervios de animales adultos (con 90 días postnatales; Fig. R4A y Tabla R2).

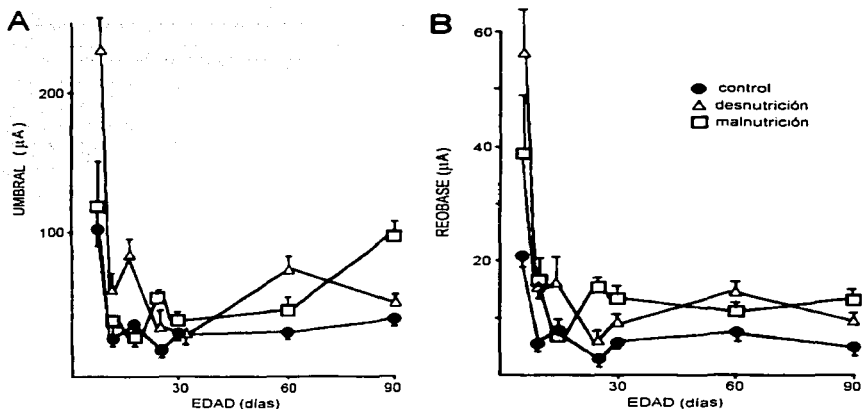


Figura R4. Efectos de la desnutrición y la malnutrición perinatales sobre: (A) el umbral eléctrico de activación ( $\mu A$ ) y (B) la corriente reobase ( $\mu A$ ) del componente A del PAC registrado en el nervio sural de la rata de diferentes edades postnatales (El tamaño de las muestras y la estadística aplicada se indican en la tabla R2).

Ahora bien, si se considera que existe una relación lineal inversa entre el diámetro de las fibras y su umbral eléctrico de activación (Patton, 1965; Rogart y Ritchie, 1977), es factible proponer que el umbral eléctrico de activación de las fibras aferentes se reduce a medida que éstas aumentan de grosor, durante el desarrollo postnatal de los animales control y experimentales.

Por otra parte, a pesar de que aparentemente los umbrales de activación de las fibras más excitables de los nervios surales desnutridos y malnutridos fueron relativamente mayores que el de los nervios control, éstos solo presentaron diferencias significativas entre si (ANOVA  $p < 0.05$ ) en algunas de las edades estudiadas (Fig. R4A y Tabla R2). A diferencia de lo anterior, los umbrales de las

fibras más excitables que generan el componente C del PAC registrado en nervios control y experimentales no mostraron diferencias estadísticas entre sí (ANOVA simple  $p > 0.05$ ; Tabla R3).

Tabla R2. Propiedades electrofisiológicas del componente A del potencial de acción compuesto (PAC) generado en nervios surales de crías control (C), desnutridas (D) y malnutridas (M) con diferentes edades postnatales (continuación de la Tabla R1).

Edad (días)	Umbral de activación ( $\mu\text{A}$ )			Reobase ( $\mu\text{A}$ )			Período refractario absoluto (ms)		
	C	U	M	C	U	M	C	U	M
8	102.7	228.1	127.8	20.7	56.7	37.6	3.9	3.0	5.1
	$\pm 12.9$ (8)	$\pm 23.6$ (8)***	$\pm 34.3$ (8)	$\pm 2.4$ (10)	$\pm 10.5$ (10)**	$\pm 9.5$ (8)	$\pm 0.2$ (8)	$\pm 0.6$ (8)	$\pm 0.1$ (8)
12	26.7	60.5	46.3	6.4	13.5	15.1	3.7	3.9	3.1
	$\pm 5.1$ (10)	$\pm 9.7$ (9)***	$\pm 9.7$ (8)***	$\pm 0.6$ (10)	$\pm 1.8$ (10)	$\pm 6.6$ (10)	$\pm 0.5$ (8)	$\pm 0.6$ (8)	$\pm 0.4$ (8)
16	36.1	86.4	33.8	8.4	15.5	7.7	2.9	2.1	2.8
	$\pm 5.2$ (9)	$\pm 10.4$ (8)***	$\pm 7.2$ (8)	$\pm 1.2$ (10)	$\pm 4.1$ (10)	$\pm 0.8$ (10)	$\pm 0.1$ (8)	$\pm 0.3$ (8)*	$\pm 0.1$ (8)
25	16.9	35.1	65.0	3.0	5.9	13.9	1.8	2.1	2.0
	$\pm 2.0$ (9)	$\pm 9.1$ (8)*	$\pm 2.2$ (8)***	$\pm 0.4$ (10)	$\pm 1.5$ (8)***	$\pm 2.8$ (8)**	$\pm 0.1$ (8)	$\pm 0.27$ (8)	$\pm 0.2$ (8)
30	29.5	30.2	47.1	4.6	8.3	11.9	1.8	1.9	1.6
	$\pm 3.5$ (9)	$\pm 3.9$ (9)	$\pm 2.7$ (10)***	$\pm 0.4$ (10)	$\pm 0.3$ (10)***	$\pm 1.1$ (10)***	$\pm 0.1$ (9)	$\pm 0.25$ (8)	$\pm 0.08$ (10)
60	30.4	74.3	56.3	5.9	13.6	10.6	1.7	1.6	1.7
	$\pm 3.6$ (10)	$\pm 8.7$ (9)	$\pm 7.1$ (10)	$\pm 0.8$ (10)	$\pm 0.7$ (8)***	$\pm 1.5$ (8)**	$\pm 0.07$ (8)	$\pm 0.05$ (8)	$\pm 0.11$ (8)
90	41.1	50.3	106	4.2	7.4	8.5	1.4	1.6	1.6
	$\pm 5.1$ (10)	$\pm 4.9$ (10)	$\pm 9.8$ (10)	$\pm 0.6$ (10)	$\pm 0.6$ (8)**	$\pm 1.2$ (8)	$\pm 0.02$ (10)	$\pm 0.07$ (10)**	$\pm 0.07$ (10)*

Valores promedio  $\pm$  error estándar. Indicaciones similares que las de la Tabla R1.

Se ha considerado que el valor reobase de los nervios es un mejor índice de la excitabilidad de las fibras nerviosas que lo componen (Noble y Stein, 1966; Aidley, 1989). En sí mismo, el valor reobase indica la cantidad mínima de carga eléctrica por unidad de tiempo que se necesita para generar potenciales de acción en los axones. La figura R4B y la Tabla R2 muestran los valores reobase promedio calculados a partir de las curvas de intensidad-duración obtenidas para

los nervios control, desnutridos y malnutridos. Como puede observarse en la gráfica B de la figura R4, los valores rebase del componente A en el PAC de nervios desnutridos y malnutridos fueron significativamente mayores que los obtenidos en nervios control (Tabla R2; ANOVA  $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente), desde los 25 días postnatales de las ratas. De acuerdo a lo anterior, nuestros resultados podrían indicar que la desnutrición y la malnutrición perinatal reducen considerablemente el diámetro de las fibras de los grupos A $\alpha$  y A $\beta$  de la rata (sin embargo, vease más adelante).

Tabla R3. Características electrofisiológicas del componente C del potencial de acción compuesto (PAC) generado en nervios surales de crías control (C), desnutridas (D) y malnutridas (M) con diferentes edades postnatales.

Edad (días)	Area ( $\mu\text{V/ms}$ )			Umbral de activación ( $\mu\text{A}$ )			Velocidad de conducción (m/s)		
	C	D	M	C	D	M	C	D	M
8	524.5 $\pm 37.7$ (8)	565.5 $\pm 70.8$ (8)	289.2 $\pm 78.1$ (8)	1390 $\pm 132$ (8)	1843 $\pm 155.4$ (8)	2666 $\pm 688$ (8)	0.56 $\pm 0.04$ (8)	0.62 $\pm 0.05$ (8)	0.62 $\pm 0.05$ (8)
12	461.1 $\pm 93.5$ (10)	315.4 $\pm 51.6$ (8)	321.5 $\pm 92.3$ (8)	311.8 $\pm 29.9$ (10)	332.0 $\pm 41.6$ (10)	208.3 $\pm 27.4$ (8)	0.56 $\pm 0.02$ (8)	0.6 $\pm 0.05$ (10)	0.6 $\pm 0.05$ (8)
16	471.0 $\pm 93.5$ (10)	582.0 $\pm 65.4$ (8)	409.1 $\pm 104.6$ (8)	206.7 $\pm 57.7$ (10)	1277 $\pm 162$ (8)	493.3 $\pm 78.6$ (8)	0.66 $\pm 0.03$ (10)	0.71 $\pm 0.03$ (8)	0.71 $\pm 0.03$ (8)
25	438.5 $\pm 51.5$ (8)	329.0 $\pm 47.2$ (8)	519.2 $\pm 196$ (8)	1090 $\pm 147$ (8)	1650 $\pm 478$ (8)	947.5 $\pm 689$ (8)	0.62 $\pm 0.08$ (8)	0.57 $\pm 0.01$ (8)	0.57 $\pm 0.01$ (8)
30	578.0 $\pm 119.2$ (8)	531.9 $\pm 76$ (10)	454.3 $\pm 132.2$ (8)	2130 $\pm 153$ (8)	1485 $\pm 118$ (10)	1060 $\pm 489$ (8)	0.6 $\pm 0.04$ (8)	0.72 $\pm 0.05$ (10)	0.72 $\pm 0.05$ (8)
60	409.3 $\pm 119.1$ (8)	273.2 $\pm 130$ (8)	243.5 $\pm 167$ (8)	1451 $\pm 201$ (8)	2850 $\pm 115$ (8)	1566 $\pm 117$ (8)	0.6 $\pm 0.05$ (8)	0.5 $\pm 0.05$ (8)	0.65 $\pm 0.05$ (8)
90	476.8 $\pm 137.1$ (8)	598.5 $\pm 79.9$ (8)	750.5 $\pm 103.2$ (8)	1335 $\pm 346$ (8)	2125 $\pm 579$ (8)	2195 $\pm 731$ (8)	0.7 $\pm 0.6$ (8)	0.69 $\pm 0.03$ (8)	0.83 $\pm 0.06$ (8)

Indicaciones similares que las de la Tabla R1.

### Periodo refractario absoluto.

Para caracterizar el posible efecto que ejerce la desnutrición o la malnutrición proteínica perinatales, sobre la capacidad de las fibras del grupo A de generar potenciales de acción después de producirse uno previo (Aidley, 1989), en este estudio analizamos el periodo refractario absoluto del componente A del PAC provocado en nervios de animales provenientes de lotes control y experimentales.

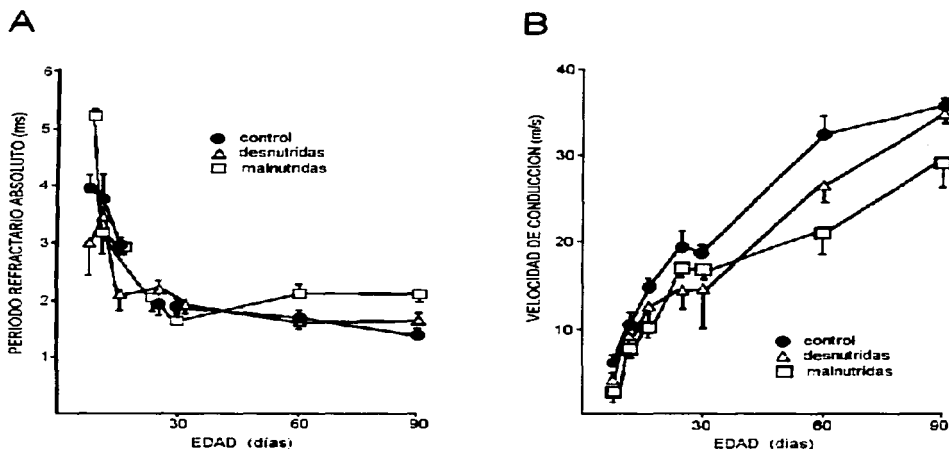


Figura R5. Efectos de las deficiencias en cantidad y calidad de alimento sobre: (A) el periodo refractario absoluto (ms) y (B) la velocidad de conducción del componente A del PAC, provocado en el nervio sural de ratas con diferentes edades postnatales (Tamaño de muestra y prueba estadística utilizada se señalan en las tablas R1 y R2).

Los resultados obtenidos (Fig. R5A y Tabla R2) muestran que prácticamente no existen diferencias significativas entre los valores del periodo refractario absoluto de los nervios controles y experimentales en todas las edades postnatales

evaluadas. Esto último podría sugerir que las fibras nerviosas mantienen su capacidad para generar potenciales de acción a pesar de la condición alimentaria de los animales (desnutrición o malnutrición proteínica).

#### **Velocidad de conducción del impulso nervioso.**

Diversos estudios previos han mostrado que la malnutrición produce una reducción significativa en la velocidad de conducción del PAC registrado en el nervio ciático de la rata (Sima y Jankowska, 1976; Oldfors y Ullman, 1980), lo cual fue asociado a una inadecuada mielinización de los axones (Wiggins, 1982). Para evaluar esta posibilidad, en este estudio determinamos la velocidad de conducción de las fibras aferentes más rápidas que generan los componentes A y C del PAC generado en nervios surales control y experimentales de la rata en desarrollo postnatal. En la figura R5B y en la Tabla R1 se indican los valores promedio de la velocidad máxima de conducción del componente A del PAC producido en nervios de animales con distintas condiciones de alimentación y de diferente edad postnatal. Como se puede apreciar en la gráfica de la figura R5B, la velocidad de conducción del PAC generado tanto en los nervios control como en los experimentales, incrementa paulatinamente a medida que se desarrollan postnatalmente los animales. Esto último, permite sugerir que a medida que crecen los axones en los nervios, éstos van adquiriendo gradualmente su capacidad para transmitir el potencial de acción. Ahora bien, entre los 8 y los 16 días, los nervios desnutridos y malnutridos presentan una velocidad máxima de conducción del componente A del PAC que no difiere significativamente de la del PAC registrado en nervios controles (Fig. R5B y Tabla R1; ANOVA simple  $p < 0.05$ ). En cambio, a partir del día 25 hasta el 60 postnatal los nervios desnutridos

presentan una velocidad de conducción significativamente menor (~10%) que la de los nervios control (Fig. R5B y Tabla R1; ANOVA  $p < 0.01$ ). A pesar de ello en el día postnatal 90 los animales desnutridos de nuevo presentan una velocidad máxima de conducción del PAC provocado en el nervio sural, similar a la de ratas control (Fig. R5B y Tabla R1). Por otra parte, los nervios malnutridos presentan velocidades de conducción semejantes a la de los control entre los 8 y los 30 días de edad, pero a los 60 y 90 días postnatales los nervios de este lote de animales conducen el PAC a velocidades significativamente menores a las de los nervios control. Estos resultados podrían indicar que tanto la desnutrición (50% de alimento) como la malnutrición proteínica provocan un retraso en el proceso de mielinización, siendo éste más severo en la malnutrición.

En contraste, la velocidad de conducción de las fibras más rápidas (alrededor de 0.5 a 0.8 m/s) que generan el componente C del PAC de los nervios control, desnutridos y malnutridos no presentan diferencias significativas entre sí, en todas las edades postnatales estudiadas (ANOVA simple  $p > 0.05$ ; Tabla R3).

Nuestros resultados permiten sugerir que las restricciones alimentarias impuestas perinatalmente inducen un retardo leve, pero significativo, en la propagación del potencial de acción a través de las fibras nerviosas mielinizadas pero no en las no-mielinizadas del nervio sural, lo cual podría deberse a una disminución o a un retardo del proceso normal de mielinización de los axones sensoriales durante el desarrollo postnatal de la rata.

### **Análisis histológico.**

Dado que las observaciones obtenidas en cada uno de los apartados anteriores implicaban alteraciones en la morfología de los axones, decidimos realizar una serie adicional de observaciones experimentales para determinar las características morfológicas generales de los axones (diámetro del nervio y el número, diámetro y grosor de la vaina de mielina de los axones) contenidos en nervios, que a su vez les fuesen evaluadas sus propiedades electrofisiológicas. Para ello, nervios sural de animales control y desnutridos con 30 y 90 días postnatales fueron divididos en dos segmentos, uno para la evaluación electrofisiológica y el otro para el análisis histológico (vease la sección de Métodos).

*Tabla R4. Características electrofisiológicas del PAC generado en segmentos de nervios surales control (C) y desnutridos (D) de ratas con 30 y 90 días de edad.*

Características	30 días		90 días	
	C	D	C	D
Área del PAC ( $\mu\text{V}\cdot\text{ms}$ )	1150.6 $\pm 209.2$	412.6 $\pm 140.6^{**}$	1597.8 $\pm 174.24$	593.6 $\pm 107.2^{**}$
Velocidad de conducción máxima (m/s)	17.52 $\pm 2.97$	13.74 $\pm 1.47^*$	32.3 $\pm 3.98$	30.6 $\pm 5.4$
Umbral de activación ( $\mu\text{A}$ )	75.0 $\pm 9.6$	100.0 $\pm 35.3$	112.5 $\pm 35.4$	117.5 $\pm 10.3$
Periodo refractario absoluto (ms)	1.65 $\pm 0.04$	1.68 $\pm 0.14$	1.88 $\pm 0.03$	1.67 $\pm 0.08$

*Valores promedio  $\pm$  error estándar. El número de nervios empleado fue de 4 por edad y condición alimentaria de los animales. Los asteriscos indican los rangos de confianza para las diferencias estadísticas entre los procedimientos control y experimentales (pruebas de ANOVA simple y posteriormente prueba de Tukey: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).*

La figura R6A y B muestra los registros típicos del componente A del PAC obtenidos en un segmento de nervios control y desnutridos de ratas con 30 y 90 días de edad postnatal, respectivamente. De igual manera que las observaciones



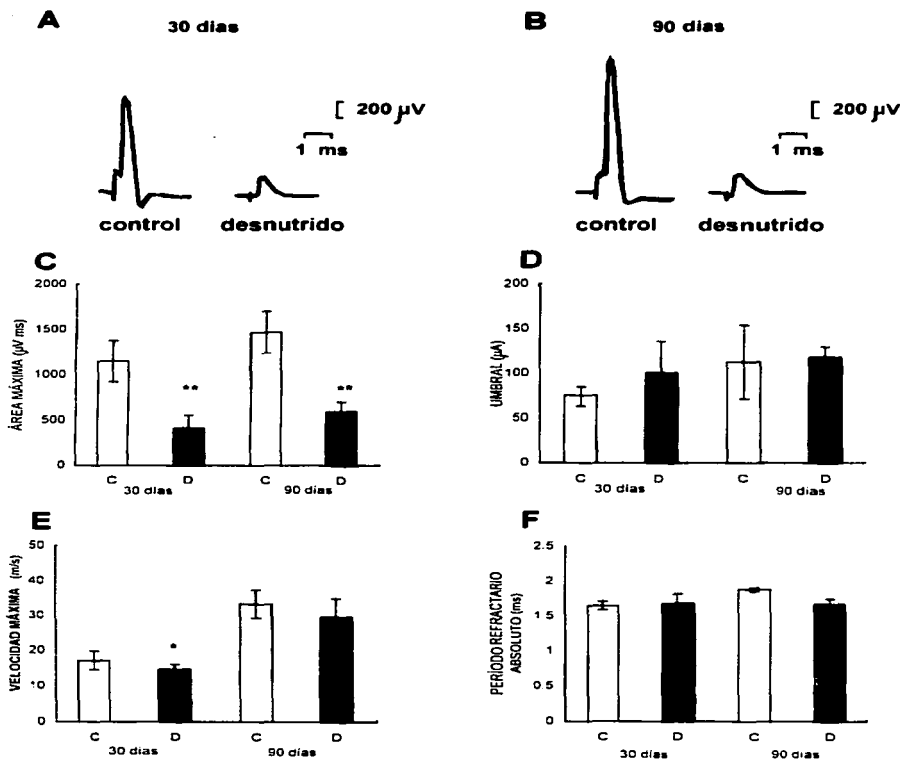


Figura R6. Efectos provocados por la desnutrición sobre las propiedades electrofisiológicas del nervio sural de ratas de 30 y 90 días de edad postnatal ( $n = 4$ ; las barras verticales representan la desviación estándar). Los asteriscos significan los rangos de significancia para las diferencias estadísticas entre los procedimientos control y experimentales (ANOVA simple: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ )

descritas en párrafos anteriores, el componente A del PAC de los nervios desnutridos se encuentran notoriamente disminuidos en su amplitud (R6A y B) y área (Fig. R6C) con respecto a los nervios control, en ambas edades postnatales (Tabla R4; ANOVA simple y posteriormente Tukey:  $p > 0.01$ ).

Sin embargo, tanto el umbral de activación (Fig. R6D), la velocidad promedio de conducción del impulso nervioso (determinada al pico del componente A del PAC; Fig. R6E y Tabla R4) y el periodo refractario absoluto (Fig. R6F) de los nervios desnutridos no mostraban diferencias significativas con respecto a los mismos parámetros pero determinados en nervios control, en las edades señaladas.

Tabla R5. Características histológicas generales de los nervios surales controles (C) y desnutridos (D) de ratas con 30 y 90 días de edad.

Características	30 días		90 días	
	C	D	C	D
Área del nervio ( $\mu\text{m}^2$ )	36, 813.8 $\pm 4362.1$	23090.3 $\pm 845.8^{**}$	48,963.7 $\pm 4987.4$	29485 $\pm 5216.5^{**}$
Número de axones (n)	1103.2 $\pm 34.3$	1230.2 $\pm 83.9$	932.5 $\pm 62.8$	948.0 $\pm 132.8$
Área del axón ( $\mu\text{m}^2$ )	4.31 $\pm 2.87$	5.02 $\pm 3.67$	4.31 $\pm 2.87$	5.02 $\pm 3.67$
Diámetro del axón ( $\mu\text{m}$ )	2.2 $\pm 0.78$	2.35 $\pm 0.9$	3.41 $\pm 0.94$	2.19 $\pm 1.01^{**}$
Grosor de la vaina de mielina ( $\mu\text{m}$ )	0.58 $\pm 0.03$	0.48 $\pm 0.03^{**}$	6.72 $\pm 1.05$	7.08 $\pm 3.16$

Valores promedio  $\pm$  error estándar. El número de nervios empleado fue de 4 por edad y por paradigma alimentario. Los asteriscos indican los rangos de confianza para las diferencias estadísticas entre los procedimientos control y experimentales (pruebas de ANOVA simple seguida de la post-prueba de Tukey:  $** p < 0.01$ ).

En tanto, los valores promedio de las características morfométricas de los axones contenidos en los segmentos de nervios surales (restantes de los segmentos analizados electrofisiológicamente) se ilustran en la figura R7 y en la

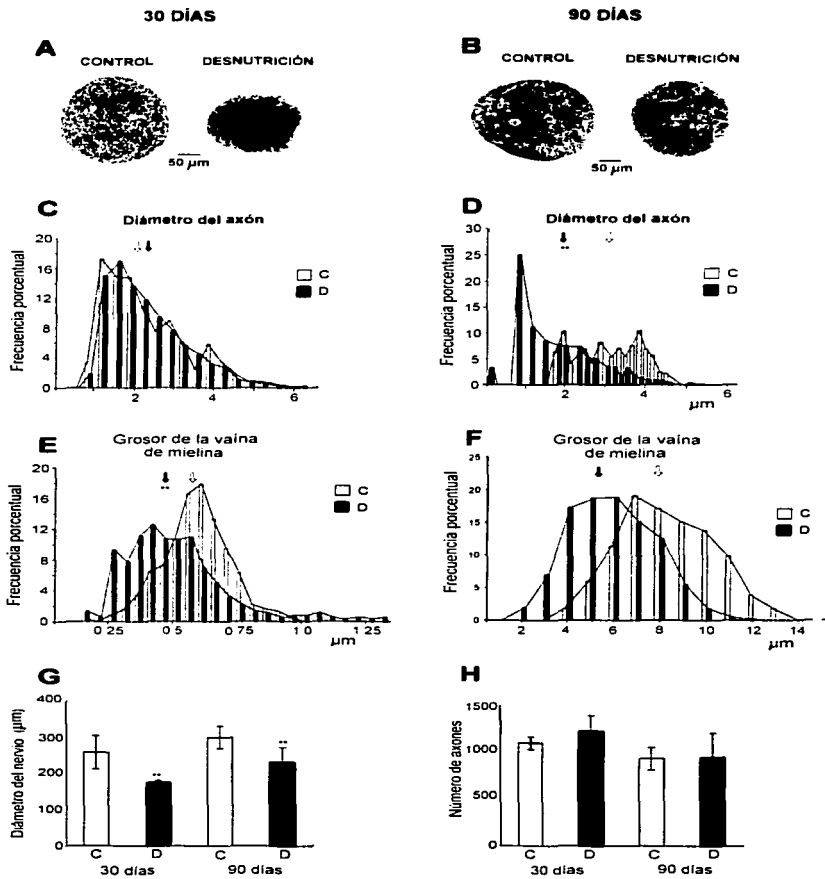


Figura R7. Efectos provocados por la desnutrición sobre la morfología del nervio sural de ratas de 30 y 90 días de edad postnatal ( $n = 4$ ; las barras verticales representan el error estándar). Las flechas vacía y llena representan los valores promedio para los lotes control y desnutrido, respectivamente. Los asteriscos (\*\*) significan  $p < 0.01$ .

tabla R5. Como se puede apreciar en la figura R7A y B, las secciones transversales de los nervios desnutridos de 30 y 90 días postnatales son significativamente de menor diámetro (Fig. R7G; ANOVA:  $p < 0.001$ ) y área (Tabla R5;  $p > 0.01$ ) que los nervios control. Por otra parte, el número (Fig. R7H; Tabla R5) así como el área (Tabla R5) de los axones contenidos en los nervios desnutridos no difirieron significativamente de los determinados en los nervios control, en todas las edades analizadas (ANOVA:  $p > 0.05$ ).

En cambio, el diámetro de los axones fue significativamente menor que el de los controles hasta los 90 días de edad (Fig. R7D y Tabla R5) pero no a los 30 días postnatales (Fig. R7C y Tabla R5). Por otra parte, el grosor de la vaina de mielina en los axones de nervios desnutridos es significativamente inferior que la de los axones control a la edad de 30 días (Fig. R7E; Tabla R5) y no a los 90 días de edad postnatal (Fig. R7F; Tabla R5).

En términos generales los resultados obtenidos en esta serie de experimentos permiten establecer que la desnutrición (y posiblemente también la malnutrición) no afecta el número de axones presentes en los nervios surales, pero es capaz de alterar la formación de la vaina de mielina (cuando menos a los 30 días postnatales) y el diámetro de los axones (a los 90 días de edad), lo cual podría alterar la generación y/o la propagación del potencial de acción en los nervios sensoriales.

## DISCUSIÓN

Los resultados experimentales obtenidos en esta segunda parte de nuestro estudio muestran las alteraciones que producen las deficiencias alimentarias perinatales en cantidad (desnutrición) o en calidad (malnutrición) sobre las características electrofisiológicas y morfológicas de nervios sensoriales durante el desarrollo postnatal de la rata. La observación más notable fue que la amplitud y el área del componente A del PAC provocado en nervios surales de animales desnutridos o malnutridos presentaron amplitudes y áreas considerablemente menores que los de nervios control. Para explicar esta observación se podría argüir que fue debida a condiciones inadecuadas o inconsistentes de registro (las cuales podrían variar de experimento en experimento). Sin embargo, dicha posibilidad fue parcialmente abolida en nuestro estudio debido a que se determinó sistemáticamente la resistencia de acople de los electrodos utilizados para el registro y la estimulación de los nervios, la cual fue establecida en valores de  $9 \pm 1$   $k\Omega$  en todas las sesiones de registro. Además de la resistencia del electrodo, también se monitoreo sistemáticamente la amplitud máxima y el umbral de activación del PAC durante toda la sesión experimental. En adición y sobre todo, el hecho de que sólo el componente A fuese afectado por las deficiencias alimentarias perinatales y no el componente C, a pesar de que ambos componentes fueron registrados en los mismos nervios y bajo condiciones experimentales similares, permiten excluir la posibilidad de que la reducción de la amplitud y área del PAC de nervios desnutridos y malnutridos resulten de la inconsistencia de las condiciones de registro y estimulación empleadas en este

estudio. Por lo tanto, parece razonable considerar que las observaciones realizadas en los nervios de animales con alimentación perinatal restringida son el resultado de alteraciones que son ajenas a las condiciones de registro y que más bien, están asociadas a los paradigmas de alimentación experimentales.

La reducción de la amplitud y del área del componente A en el CAP registrado en nervios experimentales podría explicarse si se toman en consideración las siguientes posibilidades, entre otras:

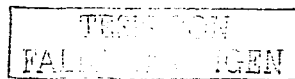
1). Una reducción substancial en el número de axones aferentes presentes en el nervio sural de los animales desnutridos o malnutridos. Dado que los resultados obtenidos en nuestro análisis histológico indican que los nervios desnutridos y malnutridos presentan prácticamente el mismo número de fibras que los nervios control a los 30 y 90 días postnatales, lo cual concuerda con las observaciones de Sima (1974a) en el nervio ciático de la rata, y refuta la hipótesis de que una reducción en el número de fibras aferentes sea la causa de la disminución de la amplitud y área del componente A del PAC de nervios experimentales.

2). Una disminución importante en la excitabilidad de las fibras aferentes. Esta posibilidad fue evaluada en el presente estudio al determinar el umbral y el valor reobase de los potenciales generados en los nervios control, desnutridos y malnutridos. Los resultados obtenidos permiten señalar que para activar las fibras aferentes más excitables del nervio sural de animales experimentales es necesario emplear una mayor densidad de corriente que la utilizada para activar los axones de nervios control. Tal situación por sí misma es indicativa de una notoria reducción en la excitabilidad de las fibras nerviosas, por lo que podría considerarse que resulta de alteraciones en las propiedades de membrana de los

axones, ya sea afectando las conductancias iónicas o la capacidad de las fibras nerviosas para generar los potenciales de acción (por ejemplo: al reducir el número de canales de sodio por área de membrana axonal; Vabnick y cols., 1996). Sin embargo, la ausencia de diferencias significativas en el período refractario absoluto del PAC generado en nervios control, desnutridos y malnutridos podría sugerir que las fibras aferentes mantienen su conductancia iónica y su habilidad para regenerar potenciales de acción a lo largo de su desarrollo postnatal a pesar de la condición de alimentación a la que fueron sometidos perinatalmente los animales. La reducción en la excitabilidad también podría explicarse si se considera una disminución en el diámetro de los axones o a una reducción en el grosor de la vaina de mielina (Patton, 1965; Aidley, 1989). El análisis histológico realizado en este estudio muestra que a los 30 días postnatales el diámetro de los axones desnutridos fue relativamente similar que el de los axones control, lo cual no concuerda con el aumento (aunque no significativo) del umbral de activación de las fibras más excitables (ver Tablas R4 y R5). En el mismo sentido, puede apreciarse que a los 90 días, el diámetro de los axones experimentales fue significativamente inferior que el de los axones control, a pesar de que ambos nervios no presentaban diferencias en su umbral de activación (Tablas R4 y R5). Las aparentes inconsistencias de nuestros resultados podrían deberse a que en el estudio histológico se contempla la evaluación del diámetro de todos los axones en los nervios, mientras que la determinación del umbral de excitación solo corresponde a las fibras nerviosas que pueden ser activadas.

Por otra parte, dado que la velocidad de conducción del PAC depende en gran medida de la presencia y de las características de la vaina de mielina que rodea a los axones que constituyen a los nervios, podría suponerse que el incremento promedio del umbral de activación así como el decremento de la velocidad de conducción del PAC en el nervio sural de animales desnutridos y malnutridos, resultan de un enlentecimiento en el desarrollo de los procesos de depósito y compactación de la mielina en los axones del nervio sural. Esta hipótesis es apoyada por investigaciones previas en las que se ha observado que los axones que constituyen el nervio ciático de ratas sometidas a desnutrición neonatal, presentan una reducción importante en el grosor de la vaina de mielina (Clos y Legrand, 1970; Hedley-White y Meuser, 1971) y en el número de lamelas que rodean a las fibras nerviosas (Sima, 1974b), lo que podría estar asociado a una deficiencia en la síntesis de los componentes de la mielina (Wysocki y Segal, 1972; Mantzos y cols., 1973).

Nuestros resultados indican que la velocidad de conducción va incrementando paulatinamente de magnitud en función de la edad, tanto en el nervio sural de los animales control como en el de los desnutridos y malnutridos, lo cual está de acuerdo con las observaciones realizadas por Fitzgerald (1985), en animales normales durante su desarrollo. Sin embargo, la tasa de incremento es menor en los nervios de animales experimentales que en el de animales control, por lo cual es factible proponer que en los tres lotes de animales se lleva a cabo el proceso de mielinización, pero es en los desnutridos en los que dicho proceso se efectúa con mayor retardo. Probablemente, el enlentecimiento de la mielinización sea provocado por la carencia parcial de todos los elementos de la dieta, entre





ellos los lípidos y las proteínas, quienes son esenciales para la formación de la vaina de mielina (Wysocki y Segal, 1972; Mantzos y cols., 1973).

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en estudios previos (Clos y Legrand, 1970; Hedley-White y Meuser, 1971; Sima, 1974b) en los que se demuestra una inadecuada formación de la vaina de mielina en axones de nervios de ratas neonatas y jóvenes desnutridas.

En este sentido, debe mencionarse que una disminución moderada en la capa de mielina en los axones induce cambios drásticos en la estructura y morfología de los nodos de Ranvier (Bowe y cols., 1994; Ritchie, 1995), lo cual atenuaría o bloquearía la propagación de los potenciales de acción a lo largo de los axones (ver: Waxman, 1977; Vabnick y cols., 1997). Conviene señalar que la ausencia o desaparición de 2 o más nodos de Ranvier es suficiente para bloquear la transmisión del impulso nervioso a través de un axón aferente (Dyck y cols., 1984 y cols. 1984). Sin embargo, lo anterior conlleva la posibilidad de que la población de axones que constituyen el nervio conduzcan los potenciales de acción con una gran dispersión de velocidades de conducción o bien, transmitan los impulsos nerviosos de manera intermitente, lo que debería de analizarse en otro tipo de estudios en donde se utilicen paradigmas de experimentación, diferentes a los empleados en este estudio pero enfocados para ese fin.

En resumen, los resultados obtenidos en esta segunda parte de la tesis, permiten establecer que la desnutrición y la malnutrición ejercen efectos de consideración sobre los procesos de generación y de propagación del impulso nervioso en los axones mielinizados, pero no en los no-mielinizados, contenidos en los nervios sensoriales de ratas en desarrollo postnatal.

## CONCLUSIONES

1. El área del componente A del PAC se reduce significativamente en los nervios de ratas desnutridas y malnutridas, con edades entre 25 y 90 días postnatales.
2. El umbral eléctrico para la generación del PAC es significativamente mayor en el nervio sural de animales desnutridos y malnutridos, que en el mismo nervio de ratas control, a partir del día 25 postnatal.
3. La desnutrición y la malnutrición proteínica no provocaron cambios en el período refractario absoluto de los nervios periféricos.
4. La velocidad máxima de conducción del PAC disminuyó significativamente en el nervio sural de ratas desnutridas y malnutridas, a partir de los 25 días de edad postnatal.
5. El análisis histológico mostró una reducción significativa en el diámetro del nervio sural de ratas desnutridas de 30 y 90 días de edad postnatal.
6. El número de axones contenidos en los nervios desnutridos fue similar al de los nervios control.
7. El diámetro de los axones que constituyen el nervio sural se redujo significativamente en ratas desnutridas de 90 días, pero no en las de 30.
8. El grosor de la vaina de mielina fue menor en los axones de animales de 30 y 90 días postnatales.

## PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos permiten establecer que la desnutrición y la malnutrición proteínica perinatales reducen significativamente la amplitud y el área del PAC, provocado por un pulso de corriente de intensidad supra-umbral. Esta reducción podría deberse a la incapacidad de las fibras nerviosas de animales desnutridos (50% de alimento) o malnutridos (caseína 6%) para generar o transmitir potenciales de acción. Ambas alteraciones pueden asociarse a una mielinización deficiente o incompleta de los axones que constiruyen el nervio sural. En este trabajo hemos mostrado que el grosor de la vaina de mielina se reduce, al menos ligeramente, en los axones del nervio sural de ratas alimentadas con dietas deficientes (fig.R7 y tabla R5).

Por otra parte, la excitabilidad de las fibras nerviosas depende directamente de el número y distribución de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , presentes en el nodo de Ranvier, y la organización y concentración de estos ocurre en la región nodal ocurre durante las primeras semanas de vida postnatal por lo que probablemente la alimentación deficiente en cantidad (desnutrición) o en calidad (malnutrición proteínica) altera su distribución y densidad. Por tal razón sería conveniente efectuar cortes longitudinales de nervios surales de ratas control, desnutridas y malnutridas para determinar si los tratamientos alimentarios aplicados modifican la longitud de los nodos de Ranvier.

Por otra parte, también podría analizarse si la realimentación (iniciada a partir del nacimiento o del destete), es capaz de revertir las alteraciones provocadas por la desnutrición y malnutrición sobre la generación y transmisión del potencial de acción.

## DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en las dos series de experimentos que constituyen el presente trabajo de tesis mostraron que la desnutrición (50 % de alimento) y la malnutrición proteínica (caseína 6%) perinatales, alteran notablemente el desarrollo de los nervios periféricos y de los músculos de las extremidades posteriores de la rata. Sin embargo, las deficiencias alimentarias modificaron selectivamente el desarrollo de las fibras musculares de sacudida rápida y de los axones con mielina, ya que las fibras musculares de sacudida lenta y los axones amielínicos de animales desnutridos y malnutridos presentaron características fisiológicas similares a las de los animales control.

No es sorprendente que las deficiencias alimentarias afecten especialmente a las fibras musculares de sacudida rápida y a los axones mielínicos, ya que ambos sistemas presentan importantes transformaciones postnatales. Así, las fibras musculares presentes en el músculo EDL deben transformarse de fibras de sacudida lenta, presentes en la rata nacida, a fibras de sacudida rápida fatigables, típicas del animal adulto; esta transformación no es simple ya que implica no solo cambios en el patrón contráctil, sino también transformaciones de naturaleza bioquímica y/o molecular como los que ocurren con la isoforma de la miosina, que en los músculos de animales recién nacidos es semejante a la de los músculos lentos del animal adulto y gradualmente se transforma en la isoforma de miosina típica de los músculos de sacudida rápida del animal adulto (Rubinstein y Kelly, 1981; Botinelli y col., 1991). Además se debe modificar el metabolismo de las fibras musculares, de oxidativo a oxidativo-glucolítico o glucolítico-oxidativo hasta

el metabolismo glucolítico característico de los músculos rápidos adultos (Schiaffino y Reggiani, 1994; Lefacheur y cols., 1998; McKoy y cols., 1998).

En cuanto a los nervios periféricos, el proceso de mielinización de los axones es también un proceso dinámico en el que se debe sintetizar y posteriormente compactar la gran cantidad de la membrana que constituirá la vaina de mielina localizada alrededor del axón (Benjamin y Smith, 1984; Jacobson, 1993). Paralelamente a la formación de la vaina de mielina se incrementa la densidad de canales de  $\text{Na}^+$  en la porción central del nodo de Ranvier lo cual implica que estos canales, que en las etapas postnatales tempranas se distribuyen uniformemente sobre toda la superficie del axón, deban desplazarse hacia el nodo de Ranvier y concentrarse en la región antes señalada (Vabnick y cols., 1996). El mismo proceso debe llevarse a cabo para concentrar los canales de  $\text{K}^+$  en la región del paranodo (Vabnick y Shrage, 1998).

El análisis histológico mostró que el número de axones contenidos en el nervio sural es semejante en los lotes control y desnutrido, pero el área de sección transversal es significativamente menor en el nervio sural de animales desnutridos que en los control. Lo anterior significa que en los nervios de ratas alimentadas con dietas deficientes se redujo, probablemente por pérdida de líquidos, el espacio existente entre los axones y por lo tanto se incrementó la densidad de fibras nerviosas por área de sección transversal. Por otra parte, es muy probable que los músculos de animales desnutridos y malnutridos también presenten una reducción en su contenido de agua. Esto a su vez, provocaría un aumento en la densidad de proteínas contráctiles por área de sección transversal y justificaría la enorme

fuerza desarrollada por los músculos de animales alimentados con dietas deficientes.

En resumen nuestros resultados sugieren que los organismos alimentados con dietas deficientes carecen de los elementos, estructurales, metabólicos y/o energéticos, que les permitirían efectuar adecuadamente la serie de transformaciones morfológicas, moleculares, metabólicas y funcionales que ocurren en los animales alimentados con dietas balanceadas, pero que en ciertos sistemas como el muscular, estas carencias puedan ser parcialmente compensadas.

## REFERENCIAS

- Aidley, D.J. (1989) **The physiology of excitable cells**. Cambridge, New York: Cambridge University Press. pp. 30-53. (nervio) y pp. 224-303. (músculo).
- Ayling, C.M., Zanelli, J.M., Moreland, B.M. y Schulster, D. (1992) Effect of human growth hormone injection on the fibre type composition and metabolic activity in a skeletal muscle from normal and hypophysectomized rats. **Growth Regulation 2**: 133-143.
- Bedi, K.S. (1994) Undernutrition of rats during early life does not affect the total number of cortical neurons. **J. Comp. Neurol.** **342**: 596-602.
- Bedi, K.S., Birzgalis, A.R., Mahon, M., Smart, J.L. y Wareham, A.C. (1982) Early undernutrition in rats. 1. Quantitative histology from underfed young and refed adult animals. **Br. J. Nutr.** **47**: 417-431.
- Benjamin, J.A. y Smith, M.E. (1984) Metabolism of myelin. En: Morell, P. (Ed.). **Myelin**. Plenum. New York. pp. 225-258.
- Billings-Gagliard, S. (1977) Mode of locomotion of Schwann cells migrating in vivo. **Am. J. Anat.** **150**: 73-88.
- Billings-Gagliard, S., Webster, H. de F. y O'Connell, M.F. (1974) In vivo and electron microscopic observations on Schwann cells in developing tadpole nerve fibers. **Am. J. Anat.** **141**: 375-392.
- Bissonnette, D.J. y Jeejeebhoy, K. (1998) Feeding a low energy diet and refeeding a control diet affect glycolysis differently in the slow- and fast-twitch muscles of adult male Wistar rats. **J. Nutr.** **128**: 1723-1730.
- Blakburn, G.L. (2001) Pasteur quadrant and malnutrition. **Nature** **409**: 397-401.
- Bostock, H. (1983). Strength-duration relationship for excitation of myelinated nerve: computed dependence on membrane parameters. **J. Physiol.** **341**: 59-74.
- Botinelli, R., Schiaffino, S. y Reggiani, C. (1991) Force-velocity relation and myosin heavy chain isoform composition of skinned fibres from rat skeletal muscle. **J. Physiol.** **437**: 655-672.
- Bovie, J. y Perl, E.R. (1975) Neural substrates of somatic sensation. En: Hunt, C.C. (Ed.). **MTP International Review of Science, Physiology Series One**. Vol. 3: Neurophysiology. pp. 303-411.
- Bowe, C.M., Johanson, C.S., Hildebrand, C. y Evans, N.H. (1994) Functional properties and nodal spacing of myelinated fibers in developing rat mental and sural nerves. **Dev. Brain Res.** **79**, 186-194.

Brameld, J.M., Buttery, P.J., Dawson, J. M. y Harper, J.M. (1998) Nutritional and hormonal control of skeletal-muscle cell growth and differentiation. **Proc. Nutr. Soc.** **57**: 207-217.

Brocard, F., Vinay, L. y Clarac, F. (1999) Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. **Dev. Brain Res.** **117**: 81-89.

Brozanski, B.S., Dado, M.J., LaFramboise, W.A., Watcho, J.F., Foley, T.P., Butler-Brown, G.S., Whalwn, R.G., Gutierre, R.D., y Ontell, M. (1991) Effects of perinatal undernutrition on elimination of immature myosin isoforms in the rat diaphragm. **Am. J. Physiol.** **261**: L49-L54.

Brozanski, B.S., Watcho, J.F. y O'day, T.L. (1993) Effect of undernutrition on contractile and fatigue properties of rat diaphragm during development. **J. Appl. Physiol.** **74**: 2121-2126.

Buckingham, M. (1994) Molecular biology of muscle development. **Cell** **78**: 15-21.

Burke, R.E., Levine, D.N., Sachmann, M. y Tsairis, P. (1974) Motor units in cat soleus muscle: physiological, histochemical and morphological characteristics. **J. Physiol.** **238**: 503-514.

Burton, R.R. y Paige, J.L. (1981). Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. **Proc. Natl. Acad. Sci. U:S:A**: **78**: 3269-3273.

Celichowski, J. y Bichler, E. (2002) The time course of the last contractions during incompletely fused tetani of motor units in the rat skeletal muscle. **Acta Neurobiol. Exp.** **62**:7-17.

Chow, B.F. y Lee, C.J. (1964) Effects of dietary restriction of pregnant rats on body weight gain of the offspring. **J. Nutr.** **82**: 10-18.

Cingolani, E.H. y Houssay, B.A. (2000): **Fisiología Humana**. El Ateneo 7<sup>a</sup>. Ed. Buenos Aires. pp. 59-93.

Clos, J. y Legrand, J. (1970) Influence de la déficience thyroïdienne et de la sous-alimentation sur la croissance et le myélisation des fibres nerveuses du nerf sciatique chez le jeune rat blanc. Étude au microscope électronique. **Brain Res.** **22**, 285-297.

Close, R. (1964) Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat during development. **J. Physiol.** **173**: 74-95.

Close, R. (1972) Dynamic properties of mammalian skeletal muscle. **Physiol. Rev.** **52**: 129-197.



Dauncey, M.J. (1990) Thyroid hormones and thermogenesis. **Proc. Nut. Soc.** **49**:203-215.

Dauncey, M.J., Burton, K.A., White, P., Harrison, A.P., Gilmour, R.S., Duchamp, C. y Cattaneo, D. (1994) Nutritional regulation of growth hormone receptor gene expression. **FASEB J.** **8**: 81-88.

Davson, H. (1970): **A Textbook of General Physiology**. Churchill 4a. Ed. Vol. 2. London. Pp.1347-1474.

Delaney, A.J., Samorajski, T., Fuller, G.N. y Wiggins, R.C. (1981) A morphometric comparison of central and peripheral hypomyelination induced by postnatal undernourishment of rats. **J. Nutr.** **111**: 746-754.

Desai, M., Crowther, N.J., Lucas, A. y Hales, N. (1996) Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. **Brit. J. Nutr.** **76**: 591-603.

Detwiler, S.R. y Kehoe, K. (1939) Further observations on the origin of the sheath cells of Schwann. **J. Exp. Zool.** **81**: 415-435.

DiFranco, M., Novo, D. y Vergara, V.L. (2002) Characterization of the calcium release domains during excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres. **Pflugers Arch.** **443**: 508-519.

Dodge, F.A. y Frankenhaeuser, B. (1958) Membrane currents in isolated frog nerve fiber under voltage clamp conditions. **J. Physiol.** **143**: 76-90.

Dodge, F.A. y Frankenhaeuser, B. (1959) Sodium currents in the myelinated nerve fiber of *Xenopus laevis* investigated with voltage clamp technique. **J. Physiol.** **148**: 188-200.

Dyck, P.J., Giannini, C. y Lais, A. (1993) Pathologic alterations of nerves. En. Dyck, P.J., Thomas, P.K., Griffin, J.W., Low, P.A. y Poduslo, J.F. (Eds.) **Peripheral Neuropathy**. W.B Saunders, Philadelphia, E.U.A. pp. 514-595.

Elder, G.C. y Vasallo, F. (1986) Histochemical and contractile properties of soleus muscle trained during development. **Pflug. Arch.** **407**: 166-169.

Erlanger, J. y Gasser, H.S. (1937) Citado en: Willis, W.D. y Cogeshall, R.E. (1978) **Sensory mechanisms of the spinal cord**, (New York: Plenum Press), pp: 9-128.

Fiorotto, M.L., Davis, T.A. y Reeds, P.J. (2000) Regulation of miofibrillar protein turnover during maturation in normal and undernourished rat pups. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** **278**:R845-854.

Fitzgerald, M. (1985) The postnatal development of cutaneous afferent fibre input and receptive field in the rat dorsal horn. **J. Physiol.** **364**: 1-18.

Friede, R.L. (1973) Mechanism of myelin sheath expansion. **Prog. Brain Res.** **40**: 425-436.

Friede, R.L., Brzoska, J. y Hartmann, U. (1985) Changes in myelin sheath thickness and internode geometry in the rabbit phrenic nerve during growth. **J. Anat. (Lond.)** **143**: 103-113.

Garlick, P.J., Milward, D.J., James, P.W. y Waterlow, J.C. (1975) The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. **Biochim. Biophys. Acta** **414**: 71-84.

Goldspink, G (1980). Growth of muscle. En: Goldspink, D. (Ed.). **Development and specialization of skeletal muscle**. Cambridge Univ. Press. Pp 19-35.

Goldspink, G. (1996) Muscle growth and muscle function: a molecular biological perspective. **Res. Vet. Sci.** **60**: 193-204.

Goldspink, G. y Ward, P. (1979) Changes in Rodent Muscle Fibre Types During Postnatal Growth, Undernutrition and Exercise. **J. Physiol.** **296**: 453-469.

Gutierrez, R., Boison, D., Heineman, O. y Stoffel, W. (1995) Decompactation of central nervous system myelin leads to a reduction of the conduction velocity of action potential in optic nerve. **Neurosc. Letters** **195**: 93-96.

Hahn, P. (1979) Nutrition and metabolic development in mammals. En: Winick, M. (Ed.) **Human Nutrition 1: Nutrition Pre and Postnatal Development**. Plenum Press. New York. pp 1-95.

Haltia, M., Berlin, O., Schucht, H. y Sourander, P. (1978) Postnatal differentiation and growth of skeletal muscle fibres in normal and undernourished rats. **J. Neurol. Sci.** **36**: 25-39.

Harrison, A.P., Tivey, D.R., Clausen, T., Duchamp, C. y Dauncey, M.J. (1996) Role of thyroid hormones in early postnatal development of skeletal muscle and its implications for undernutrition. **Brit. J. Nutr.** **76**: 841-855.

Harrison, L.M. (1975) Fiber diameter spectrum of the motor fibers of rat sural nerve. **Exp. Neurol.** **47**: 364-366.

Hedley-White, E.T. y Meuser, C.S. (1971) The effect of undernutrition on myelination of rat sciatic nerve. **Lab. Invest.** **24**: 156-161.

Hegarty, P.V.J. y Kim, K.O. (1980) Changes in skeletal muscle cellularity in starved and refed young rats. **Br. J. Nutr.** **44**: 123-127.

Heidemann, S.R., Landers, J.M. y Hamborg, M.A. (1981) Polarity orientation of axonal microtubules. **J. Cell Biol.** **91**: 661-665.

Hill, A.V. (1938) The heat of shortening and dynamic constants of muscle. **Proc. Roy. Soc. B** **126**: 136-195.

Howart, R.E. (1972) Influence of Dietary Protein on Rat Skeletal Muscle Growth. **J. Nutr.** **102**: 37-39.

Howells, K.F. Jordan, T.C. y Mathews, D.R. (1978). Effects of pre- and peri-natal undernutrition on muscle fibre and function in fast and slow rat muscles. **Proc. Nutr. Soc.** **37**: 112A.

Howells, K.F. y Jordan, T.C. (1978) The myofibril content of histochemically characterized rat muscle fibre types. **J. Physiol.** **284**: 35P-38P.

Huxley, A.F. y Niedergerke, R. (1954) Structural changes in muscle during contraction. **Nature.** **173**: 971-973.

Huxley, H. y Hanson, J. (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. **Nature.** **173**: 973-976.

Ihemelandu, E.C. (1985) Fibre number and size of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. **Acta Anat.** **124**: 89-92.

Ikemoto, N. y Yamamoto, T. (2000) The luminal Ca<sup>2+</sup> transient controls Ca<sup>2+</sup> release/re-uptake of sarcoplasmic reticulum. **Biochem. Biophys. Res. Commun** **279**: 858-863.

Jacobson, M. (1993) **Developmental neurobiology**. Plenum Press. New York and London. pp. 163-215.

Jacobson, M., y Huang, S. (1985) Neurite outgrowth traced by means of horseradish peroxidase inherited from neuronal ancestral cells in frog embryos. **Biol. Biol.** **110**: 102-113.

Johnson, J.D., Wogenrich, W.J., Hsi, K.C., Skipper, B.J. y Greenberg, R.E. (1991) Growth retardation during the suckling period in expanded litters of rats: observations of growth patterns and protein turnover. **Growth Dev. Aging.** **55**: 263-273.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (1997) **Principles of Neural Science**. Appleton and Lang. Norwalk, Connecticut. pp. 349-351 (nervio) y pp. 548-563 (músculo).

Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.** **27**:137A-138A.

Katsumata, M., Burton, K.A., White, P., Cattaneo, D. y Dauncey, M.J. (1997) Growth hormone receptor gene expression is related to metabolic and contractile properties of muscle. **J. Endocrinol.** **152**: P125.

Kelsen, S.G., Ference, M. y Kapoor, S. (1985) Effects of prolonged undernutrition on structure and function of the diaphragm. **J. Appl. Physiol.** **58**: 1354-1359.

Keynes, A.M. y Aidley, D.J. (1985) **Nerve and Muscle**. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 1-10 (nervio) y pp. 103-140 (músculo).

Keynes, P.D. y Aidley, D.J. (1985): **Nerve and muscle**. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp.

Komisaruk, R.B, Adler, N.T. y Hutchinson, J. (1972) General sensory field: enlargement by estrogen treatment in female rats. **Science** **178**: 1295-1298.

Krigman, M.R. y Hogan, E.L. (1976) Undernutrition in the developing rat: effect upon myelination. **Brain Res.** **107**: 239-255.

Lai, M. y Lewis, P.D.(1980). Effects of undernutrition on myelination in rat corpus callosum. **J. Comp. Neurol.** **193**: 973-982.

Lapicque, L. (1907). Recherches quantitatives sur l'excitation électrique des nerfs traitée comme une polarisation. **J. Physiol.**, **9**: 622-635.

Lefaucheur, L., Hoffman, R.K., Gerrard, D.E., Okamura, C.S., Rubinstein, N. y Kelly, A. (1998) Evidence for three adult fast myosin heavy chain isoforms in type II skeletal muscle fibers in pigs. **J. Animal Sci.** **76**: 1584-1593.

Lehninger, A. L. (1970): **Biochemistry**. Worth Publishers, Inc. New York. pp 208-213.

Lewis, A.J., Wester, T.J., Burn, D.G. y Dauncey, M.J. (2000) Exogenous growth hormone induces somatotrophic gene expression in neonatal liver and skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** **278**: R838-R844.

Lidell, E.G.T. y Sherrington, C.S. (1925) Further observations on myothatic reflexes. **Proc. Roy. Soc. B** **97**: 267-283.

Liguori, R. y Trojaborg, W. (1990) Are there motor fibers in the sural nerve?. **Muscle and Nerve** **13**:12-15.

Lloyd, D.P. C. y Chang, H.T. (1948) Afferent fibers in muscle nerves. **J. Neurophysiol.** **11**: 199-208.

Lopes, J., Russell, D.M., Whitwell, B.S. y Jeejeebhoy, K.N. (1982) Skeletal Muscle Function in Malnutrition. **Amer. J. Clin. Nut.** **36**: 602-610.

Lubinska, L. (1961) Sedentary and migratory states of Cchwann cells. **Exp. Cell Res. Suppl. 8**: 74-90.

Lutz, H., Weber, H., Billeter, R. y Jenny, E. (1979) Fast and slow myosin coexist within single skeletal muscle fibers of adult rabbits. **Nature 281**: 142-144.

Mabuchi, K., Szvetko, D., Pinter, K. Y Sreter, F.A. (1982) Type IIB to IIA fiber transformation in intermittently stimulated rabbit muscles. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 242** : C373-C381.

Mantzou, J.D., Chiotaki, L. y Levis, G.M. (1973) Biosynthesis and composition of brain galactolipids in normal and hypothyroid rats. **J. Neurochem. 21**: 1207-1213.

Martonosi, A.N. (1996) Structure-function relationships in the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum: facts, speculations and questions for the future. **Biochim. Biophys. Acta 1275**: 111-117.

McKoy, G., Leger, M.E., Bacou, F. y Goldpink, G. (1998) Differential expression of myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in four functionally diverse rabbit skeletal muscles during pre- and postnatal development. **Dev. Dynamics 21**: 193-203.

Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R.J., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. y Galler, J.R. (1993) Prenatal malnutrition and the development of the brain. **Neurosc. and Biobehav. Rev.**: 17: 91-128.

Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R.J., Bronzino, J., Tonkiss, J., y Galler, J.R. (1992) Malnutrition and the developing Central Nervous System. In: Isaacson, R.L. y Jensen, K.F. (Eds.), **The vulnerable Brain and Environmental Risks**. Vol. 1. Malnutrition and Hazard Assessment. (New York, London: Plenum Press), pp. 3-44.

Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E. y Resnick, O. (1978) The Effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neurosc. And Biobehav. Rev. 2**: 137-230.

Muller, A., van der Linden, G.C., Zuidwijk, M.J., Simonides, V.S., van der Laarse, W.J. y van Hardeveld, C. (1994) Differential effects of thyroid hormone on the expression of sarcoplasmic reticulum Ca (2+)-ATPase isoforms in rat skeletal muscle fibers. **Biochem. Biophys. Res. Commun 203**: 1035-1042.

Munro, M. y Crick, F. H. C. (1971) The time needed to set up a gradient: detailed calculations. **Symp. Soc. Exp. Biol. 25**: 439-453.

Munson, J.B., Fleshman, J.W., Zengel, J.E. y Sybert, G.W. (1984) Synaptic and mechanical coupling between type-identified motor units and individual spindle afferents of medial gastrocnemius muscle of the cat. **J. Neurophysiol.** **51**: 1268-1283.

Nakanishi, T. y Forbes, N. (1970) Motor fibers in rat sural nerve. **Exp. Neurol.** **26**: 433-435.

Navarrete, R. y Vrbova, G. (1993) Activity-dependent interactions between motoneurons and muscles: their role in the developing of the motor unit. **Prog. Neurobiol.** **41**: 93-124.

Nemeth, P.H., Norris, B.J., Solanski, L. y Kelly, A.M. (1989) Metabolic specialization in fast and slow muscle fibers of the developing rat. **J. Neurosc.** **9**: 2336-2343.

Noble, D. y Stein, R.B. (1966) The threshold conditions for initiation of action potentials by excitable cells. **J. Physiol.** **187**, 129-162.

Oldfors, A. y Ullman, M. (1980) Motor nerve conduction velocity and nerve fiber diameter in experimental protein deprivation. **Acta Neuropathol.** **51**: 215-221.

Patton, T.C. (1965) Special properties of nerve trunks and tracts. In: Ruch, T.C., Patton, H.D., Woodbury, J y Towe, A. (Eds), **Physiology and biophysics**. Philadelphia, London: W.B. Saunders Company), pp. 73-95.

Popesko P., Rajtová, V. y Horák, J. (1992) **A colour atlas of the anatomy of small laboratory animals**. Vol. 2: rat, mouse and golden hamster. London: Wolfe Publishing Ltd. pp. 93 (músculo) y (94, 101) nervio.

Ratner, N., Glaser, L. y Smith, M.E. (1984) PC12 cells as a source of neurite-derived cell surface mitogen which stimulates Schwann cells division. **J. Cell. Physiol.** **98**: 1150-1155.

Ritchie, J.M. (1995) Physiology of axons. En: Waxman, S.G., Kocsis, J.D. y Stys, P.K. (Eds.), **The Axon: Structure, Function and Pathophysiology** (New York, London: Oxford University Press), pp. 328-340.

Robain, O. y Ponsot, G. (1978) Effects on undernutrition on glial maturation. **Brain Research** **149**: 379-397.

Rogart, R.B. y Ritchie, J.M. (1977) Physiological basis of conduction in myelinated nerve fibers. In: Morell, P. (Ed.): **Myelin** (New York, London: Plenum Press), pp. 117-159.

Rubinstein, N. y Kelly, A. (1981) Development of Muscle Fiber Specialization in the Rat Hindlimb. **J. Cell. Biol.** **90**: 128-144.

Russell, D., Atwood, H., Whittaker, S., Itakura, I., Walker, M., Mickle, D. y Jeejeebhoy, K. (1984 b) The effect of fasting and hypocaloric diets on the functional and metabolic characteristics of rat gastrocnemius muscle. **Clin. Science** **67**: 185-194.

Russell, D., Leiter, L.A., Whitwell, J., Marliss, E.B. y Jeejeebhoy, K.N. (1983) Skeletal muscle function during hypocaloric diets and fasting: a comparison with standard nutritional assessment parameters. **Am. J. Clin. Nutr.** **37**: 133-138.

Russell, D., Walker, P., Leiter, L., Sima, A., Tanner, W., Mickle, D., Whitwell, J., Marliss, E. y Jeejeebhoy, K. N. (1984 a) Metabolic and structural changes in skeletal muscle during hypocaloric dieting. **Am. Clin. Nutr.** **39**: 503-513.

Saiki, Y. y Ikemoto, N. (1999) Coordination between  $Ca^{2+}$  release and subsequent re-uptake in the sarcoplasmic reticulum. **Biochem.** **38**: 3112-3119.

Salzer, J.L., Williams, A.K., Glaser, L. y Bunge, R.P. (1980) Studies of Schwann cell proliferation: II Characterization of the stimulation and specificity of the response to a neurite membrane fraction. **J. Cell. Biol.** **84**: 753-766.

Schiaffino, S. y Reggiani, C. (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** **77**: 493-501.

Segura, B. (1993) Efecto de la Desnutrición Neonatal sobre las propiedades funcionales del músculo esquelético de la rata. **Tesis de Maestría. CINVESTAV, IPN.** Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. 105 pp.

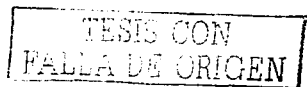
Sieck, G.C., Lewis, M.I. y Blanco, C.E. (1989) Effects of undernutrition on diaphragm fiber size, SDH activity, and fatigue resistance. **J. Appl. Physiol.** **66**: 2196-2205.

Sima, A. (1974a) Studies on fibre size in developing sciatic nerve and spinal roots in normal, undernourished, and rehabilitated rats. **Acta Physiol. Scand. Suppl.** **406**, 3-55.

Sima, A. (1974b) Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibres of ventral and dorsal roots and optic nerve in normal, undernourished and rehabilitated rats. An ultrastructural morphometric study. **Acta Physiol. Scand. Suppl.** **410**, 3-38.

Sima, A. y Jankowska, E. (1976) Sensory nerve conduction velocity as correlated to fibre size in experimental undernutrition in the rat. **Neuropathol. and Applied Neurobiol.** **1**, 31-37.

Stacey, M. (1949). Free nerve endings in skeletal muscle of the cat. **J. Anat.** **105**: 231-254.



Stys, P.K. (1993) Suction electrode recording from nerves and fiber tracts. A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology. In: Kettenman, H. y Grantyn, R. (Eds.), **Practical electrophysiological methods** (New York, Brisbane, Toronto, Singapore: Wiley-Liss), pp. 189-194.

Stys, P.K. y Kocsis, J.D. (1995) Electrophysiological approaches to the study of axons. In: Waxman, S.G., Kocsis, J.D. y Stys, P.K. (Eds.), **The Axon: Structure, Function and Pathophysiology**. (New York, Oxford: Oxford University Press), pp. 328-340

Stys, P.K., Ranson, B.R. y Waxman, S.G. (1991) Compound action potential of nerve recorded by suction electrode: a theoretical and experimental analysis. **Brain Res.** **546**, 18-32.

Vabnick, I. y Shrage, P. (1998) Ion channel redistribution and function during development of the myelinated axon. **J. Neurobiol.** **37**: 80-96.

Vabnick, I., Messing, A., Chiu, S.Y., Levinson, S. R., Schachner, M., Roder, J. Chumei, L., Novakovic, S. y Schragar, P. (1997) Sodium channel distribution in axons of hypomyelinated and MAG null mutant mice. **J. Neurosc. Res.** **50**: 321-336.

Vabnick, I., Novakovic, S.D., Levinson, S.R., Schachner, M. y Shragar, P. (1996) The clustering of axonal sodium channels during development of the peripheral nervous system. **J. Neurosc.** **16**: 4914-4922.

Wareham, A.C., Mahon, M., Bedi, K.S. y Smart, J.L. (1982) Early life undernutrition in rats 2. Some contractile properties of skeletal muscles from adult animals. **Br. J. Nutr.** **84**: 185-194.

Warren G.L., Ingalls, C.P., Lowe, D.A. y Armstrong, R.B. (2001) Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury. **Exerc. Sport. Sci. Rev.** **29**: 82-87.

Warren G.L., Ingalls, C.P., Lowe, D.A. y Armstrong, R.B. (2002) What mechanism contribute to the strength loss that occurs during and in the recovery from skeletal muscle injury?. **J. Orthop. Sports. Phys. Ther.** **32**: 58-64.

Waterlow, J.C. y Stephen, J.M.L. (1969) Enzymes and assesment of protein nutrition. **Proc. Nutr. Soc.** **28**: 234.

Waxman, S.G. (1977) Conduction in myelinated, Unmyelinated, and demyelinated fibers. **Arch. Neurol.** **34**: 585-589.

Weiss, G. (1901). Sur la possibilité de rendree comparables entre eux les appareils servant 'a l'excitation électrique. **Archs. Ital. Biol.** **35**: 413-446.



White, P., Cattaneo, D. y Dauncey, M.J. (2000) Postnatal regulation of myosin heavy chain isoforms and metabolic enzyme activity by nutrition. **Brit. J. Nutr.** **84**: 185-190.

Wiggins, R. (1982) Myelin development and nutritional insufficiency. **Brain Res. Rev.** **4**, 151-175.

Willis, W.D. y Cogeshall, R.E. (1978) **Sensory mechanisms of the spinal cord**, (New York: Plenum Press), pp: 9-128.

Wilson, P. y Kitchener, P.D. (1996) Plasticity of cutaneous primary afferent projections to the spinal dorsal horn. **Prog. Neurobiol.** **48**: 105-129.

Wilson, S.J., Ross, J.J. y Harris, A.J. (1988) A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. **Development** **102**: 815-821.

Winick, M. (1979) **Human Nutrition. 1: Nutrition Pre and Postnatal Development**. Plenum Press. New York. pp 470.

Wood, P.M. y Bunge, R.P. (1975) Evidence that sensory axons are mitogenic for Schwann cells. **Nature** **256**: 662-664.

Wysocki, S. J. y Segal, W. (1972) Influence of thyroid hormones on enzymatic activities of myelinating rat central-nervous tissues. **Eur. J. Biochem.** **28**: 183-189.

Zar, J.H. (1974). **Biostatistical Analysis**. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey. pp 121-124.

## Effect of Perinatal Food Deficiencies on the Compound Action Potential Evoked in Sensory Nerves of Developing Rats

B. SEGURA<sup>a</sup>, J.C. GUADARRAMA<sup>b</sup>, A.L. GUTIERREZ<sup>a</sup>, H. MERCHANT<sup>c</sup>, L. CINTRA<sup>d</sup> and I. JIMÉNEZ<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>*Escuela Nacional de Estudios Profesionales "Iztacala", Mexico, Mexico;* <sup>b</sup>*Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, AP 14-740 Mexico, D.F. CP 07000, Mexico;* <sup>c</sup>*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Mexico, Mexico;* <sup>d</sup>*Centro de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM, Mexico, Mexico*

(Received 5 June 2001; Revised 2 July 2001; In final form 23 July 2001)

The aim of this study was to analyze the possible alterations produced by inadequate perinatal food intake, in quantity (undernutrition) or quality (malnutrition), on the generation and propagation of the compound action potential (CAP) evoked in sensory sural nerves, during the postnatal development of the rat. Low intensity stimulation (2–3 times the threshold of the most excitable nerve fibers;  $\times T$ ) of the sural nerve evoked an early potential (CAP-A component) which is due to activation of low-threshold, fast-conducting myelinated group A afferent fibers. Meanwhile, at higher stimulus intensity (20–30 $T$ ) it produced a second, long-lasting potential (CAP-C component) probably due to activation of high-threshold, slow-conducting group A $\delta$  or C afferent fibers. Compared to control nerves, the CAP-A component, but not the CAP-C component of undernourished and malnourished nerves showed significant changes in amplitude, area, electrical threshold and conduction velocity (except absolute refractory period) at several postnatal ages. Our results may suggest that a relative large number of myelinated group A afferent fibers in the sural nerve of undernourished and malnourished animals suffer severe alterations on their

electrophysiological properties of generation and propagation of the action potential during the postnatal development of the rat.

**Keywords:** Compound action potential; Postnatal development; Perinatal undernutrition; Malnutrition

### INTRODUCTION

Considerable efforts have been made to characterize the possible anatomical, neurochemical and physiological consequences produced by food deficiencies in quantity and/or quality, on the development of the central nervous system (CNS; for review see: Morgane *et al.*, 1978, 1992, 1993). In the rat, pre- and post-natal protein deprivations produce remarkable alterations in

\*Corresponding author. Tel.: +52-5-7477000, ext. 5163. Fax: +52-5-7473754. E-mail: [ijimenez@fisio.cinvestav.mx](mailto:ijimenez@fisio.cinvestav.mx)

auditory, reaching and startle reflexes (Smart and Dobbing, 1971; Kawaii *et al.*, 1989) and in painful and/or aversive responses (Frankova and Barnes, 1968; Levitsky and Barnes, 1970; Lynch, 1976). Some of these observations have been associated to changes in the propagation of action potentials through sensory pathways. On this regard, a significant decrease in conduction velocity of the compound action potential (CAP) recorded in the sciatic nerve of malnourished rats has been observed (Sima and Jankowska, 1976; Oldfors and Ullman, 1980). This change has been attributed to inadequate myelination of axons in the nerve (Krigman and Hogan, 1976; Wiggins, 1982). Similar observations were also obtained from the cortico-spinal tract (Quirk *et al.*, 1995), optic nerve (Bronzino *et al.*, 1975), and sensory and motor nerves (Oldfors and Ullman, 1980; Comblath and Brown, 1988).

Despite large amount of evidence concerning the effect of undernutrition and malnutrition on large diameter afferent fibers, there is a lack of information about the possible alterations produced by inadequate perinatal nourishments on the electrophysiological properties of thin and thick afferent fibers.

In this study we have analyzed the possible consequences of perinatal low-protein (malnourished) and hypo-caloric (undernourished) food intake, on the generation and propagation of low- and high-threshold components evoked in the compound action potential of sensory sural nerves during the postnatal development of the rat. Data obtained in this study was partially published in abstract form elsewhere (Segura *et al.*, 1996, 1997, 1999).

## MATERIALS AND METHODS

Three groups of female Wistar rats were subjected to different feeding conditions: (A) *Control*: One group of female rats and their offspring had free access to food throughout the whole experimental period (Lab Diet, Formulab

5008). (B) *Undernourished*: Rats fed with half of the food intake of control animals from three to four weeks before mating and during pregnancy and lactation periods (Chow and Lee, 1964; Bedi, 1994). The corresponding offsprings were also undernourished after the weaning period (21 postnatal day). (C) *Malnourished*: An additional group of female rats and their offspring was fed with pellets of low-protein content (6% casein, Teklad, Madison, WI) during the same pre- and post-natal periods as the undernourished group.

All animals had free access to water and were housed under identical environmental conditions of light and dark cycles (12:12h) and temperature (22–24°C). After parturition, the sex and number of pups was determined and adjusted to 8 males per litter and their body weight was measured every day until the day of experiment (see Table I). All experiments were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

## Surgical Procedures

At 8, 12, 16, 25, 30, 60 and 90 postnatal days, pups or young rats from control and experimental groups were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg). Both hindlimb sural nerves (see: Popesko *et al.*, 1990) were carefully dissected out and placed on a recording chamber, previously filled with oxygenated Krebs solution: (NaCl, 128 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1.0 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 21 mM; glucose, 35 mM) and maintained at room temperature (22–24°C). We decided to use the sural nerve instead of the sciatic nerve because it is mainly composed of cutaneous afferent fibers originated from sensory receptors in the hindlimb skin (Willis and Cogeshall, 1978; however see: Liguuri and Trojaborg, 1990; Nakanishi and Forbes, 1970).

128

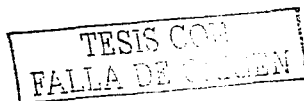


TABLE I Electrophysiological characteristics of the A component in the CAP evoked in sural nerves of control (C), undernourished (U), and malnourished (M) animals at different postnatal ages. (Average and standard error values are shown. The number of nerves used per age and food condition are shown in parenthesis and asterisks indicate the confidence ranges for the statistical differences between control and experimental procedures (single ANOVA and Tukey tests: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

Age (days)	Body weight (g)			PAC area ( $\mu V ms$ )			Threshold ( $\mu A$ )		
	C	U	M	C	U	M	C	U	M
8	21.6 $\pm$ 0.5 (10)	11.3 $\pm$ 0.3 (12)***	8.2 $\pm$ 0.4 (8)***	453.5 $\pm$ 192 (8)	356.9 $\pm$ 75.1 (8)	153.9 $\pm$ 25.3 (8)	102.7 $\pm$ 12.9 (8)	228.1 $\pm$ 23.6 (8)	127.8 $\pm$ 34.3 (8)
12	28.6 $\pm$ 1.0 (14)	14.1 $\pm$ 0.5 (10)***	11.0 $\pm$ 0.4 (10)***	502.3 $\pm$ 127 (9)	375.9 $\pm$ 80.1 (10)	339.2 $\pm$ 38.6 (9)	26.7 $\pm$ 5.1 (10)	60.5 $\pm$ 9.7 (8)***	46.3 $\pm$ 9.7 (8)***
16	41.8 $\pm$ 0.6 (16)	17.5 $\pm$ 0.7 (14)***	13.6 $\pm$ 0.4 (14)***	699.8 $\pm$ 60.1 (8)	531.8 $\pm$ 114 (8)	429.6 $\pm$ 125 (10)**	36.1 $\pm$ 5.2 (8)	86.4 $\pm$ 10.4 (8)***	33.8 $\pm$ 7.2 (8)
25	56.9 $\pm$ 1.3 (11)	21.9 $\pm$ 1.2 (9)***	23.1 $\pm$ 1.1 (9)***	1085 $\pm$ 52.6 (10)	466.7 $\pm$ 23.9 (9)***	501.7 $\pm$ 38.9 (9)***	16.9 $\pm$ 2.0 (8)	35.1 $\pm$ 9.1 (8)***	65.0 $\pm$ 2.2 (8)***
30	111.6 $\pm$ 3.2 (14)	32.0 $\pm$ 1.7 (14)***	21.1 $\pm$ 1.1 (14)***	1261 $\pm$ 117 (10)	496.8 $\pm$ 60.7 (10)***	514.6 $\pm$ 102 (10)***	29.5 $\pm$ 3.5 (9)	30.2 $\pm$ 3.9 (9)	47.1 $\pm$ 2.7 (10)***
60	285.3 $\pm$ 6.0 (11)	116.2 $\pm$ 4.9 (9)***	32.9 $\pm$ 7.0 (9)***	1462 $\pm$ 144 (9)	167.9 $\pm$ 149 (10)***	508.1 $\pm$ 72.2 (9)***	30.4 $\pm$ 3.6 (10)	74.3 $\pm$ 8.7 (9)	56.3 $\pm$ 7.1 (10)
90	410.8 $\pm$ 8.0 (10)	150.1 $\pm$ 9.6 (10)***	49.7 $\pm$ 2.6 (10)***	2313 $\pm$ 206 (10)	751.1 $\pm$ 105 (10)***	733.5 $\pm$ 164 (10)***	41.1 $\pm$ 5.1 (10)	50.3 $\pm$ 4.9 (10)	106 $\pm$ 9.8 (10)
Age (days)	Rheobase ( $\mu A$ )			Absolute refractory period (ms)			Conduction velocity (m/s)		
	C	U	M	C	U	M	C	U	M
8	102.7 $\pm$ 12.9 (8)	228.1 $\pm$ 23.6 (8)***	127.8 $\pm$ 34.3 (8)	3.9 $\pm$ 0.2 (8)	3.0 $\pm$ 0.6 (8)	5.1 $\pm$ 0.1 (9)	6.1 $\pm$ 0.6 (9)	3.9 $\pm$ 0.4 (8)	4.7 $\pm$ 0.6 (8)
12	26.7 $\pm$ 5.1 (10)	60.5 $\pm$ 9.7 (9)***	46.3 $\pm$ 9.7 (8)***	3.7 $\pm$ 0.5 (8)	3.9 $\pm$ 0.6 (8)	3.1 $\pm$ 0.04 (8)	10.4 $\pm$ 0.7 (10)	9.3 $\pm$ 3.1 (10)	8.9 $\pm$ 1.0 (9)
16	36.1 $\pm$ 5.2 (9)	86.4 $\pm$ 10.4 (8)***	33.8 $\pm$ 7.2 (8)	2.9 $\pm$ 0.1 (8)	2.1 $\pm$ 0.3 (8)	2.8 $\pm$ 0.1 (10)	14.9 $\pm$ 0.9 (8)	12.3 $\pm$ 0.7 (10)	11.4 $\pm$ 1.1 (10)**
25	16.9 $\pm$ 2.0 (9)	35.1 $\pm$ 9.1 (8)***	65.0 $\pm$ 2.2 (8)***	1.8 $\pm$ 0.1 (8)	2.1 $\pm$ 0.27 (8)	2.0 $\pm$ 0.2 (8)	19.4 $\pm$ 1.8 (10)**	14.3 $\pm$ 1.8 (10)**	18.7 $\pm$ 1.4 (9)
30	29.5 $\pm$ 3.5 (9)	30.2 $\pm$ 3.9 (9)	47.1 $\pm$ 2.7 (10)***	1.8 $\pm$ 0.1 (9)	1.4 $\pm$ 0.25 (8)	1.8 $\pm$ 0.08 (10)	18.7 $\pm$ 0.8 (10)**	14.6 $\pm$ 0.7 (10)**	15.7 $\pm$ 1.0 (10)
60	30.4 $\pm$ 3.6 (10)	74.3 $\pm$ 8.7 (9)	56.3 $\pm$ 7.1 (10)	1.7 $\pm$ 0.07 (10)	1.6 $\pm$ 0.05 (8)	1.7 $\pm$ 0.11 (8)	32.5 $\pm$ 2.1 (10)	26.5 $\pm$ 2.1 (9)	22.4 $\pm$ 2.5 (10)***
90	41.1 $\pm$ 5.1 (10)	50.3 $\pm$ 4.9 (10)	106 $\pm$ 9.8 (10)	1.4 $\pm$ 0.02 (10)	1.6 $\pm$ 0.07 (10)**	1.6 $\pm$ 0.07 (10)**	35.5 $\pm$ 1.2 (10)	35.5 $\pm$ 2.2 (10)	41.1 $\pm$ 5.1 (10)

### Stimulation and Recording

Both ends of the sural nerve were drawn into suction electrodes in order to record and evoke the compound action potential. One electrode was wrapped around with an isolated wire and connected to a pulse generator and the other electrode was connected to a low-noise, high-gain differential amplifier (band pass filters 0.3–10 kHz). The resistance of the recording electrode (Rp) was determined by measuring the voltage drop that occurs when a constant voltage pulse (1–2 V, 5 ms) was passed

across the electrode with the nerve inserted on it (Stys, 1993; Stys *et al.*, 1991; Stys and Kocsis, 1995). The system was previously calibrated by passing the same voltage pulse through a 10 M $\Omega$  resistor. Particular effort was made to have similar electrode resistance (Rp = 8–10 k $\Omega$ ), independently of nerve diameter, in all recording sessions by checking the proper fitting of electrodes and their Rp.

The CAP was evoked in all experiments, by single square current pulses (0.05 ms duration) of graded intensity. The electrical threshold ( $1 \times T$ ) of the CAP was established as the minimal

2: 129

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

current intensity necessary to activate the most excitable fibers in the nerve. The stimulus strength-duration relationship was obtained by determining the current strength needed to produce a barely discernible response in the nerve at different stimulus pulse duration (from 0.05 to 1 ms). The rheobase was calculated as the change of charge per unit of time ( $dQ/dt$ ), derived from the strength-duration curves (see: Noble and Stein, 1966; Aidley, 1989). The stimulus current was measured as a voltage drop across a 1000  $\Omega$  resistor placed in the return path to ground.

The maximal evoked response in the nerve was obtained by increasing the stimulus strength at multiples of the electrical threshold (A component: 2-3 $\times$ , and C component: 20-30 $\times$ ; see Fig. 1). In addition, the absolute refractory period was determined as the time interval between two stimulating pulses in which the second stimuli was unable to evoke any response in the nerve. The recording and stimulating conditions were assessed routinely along the experimental session by monitoring the maximal amplitude and threshold of the CAP. The whole observation was discarded when a variation of 10% or greater occurred either in amplitude and/or threshold of the CAP.

### Data Processing

The evoked CAPs were digitized, averaged ( $n = 16$  samples at 1 Hz), integrated and stored by means of a specially designed computer program. The maximal conduction velocity was calculated as the length of the nerve divided by the time elapsed from the stimulus artifact to the initial phase of each CAP-component. Raw data were routinely recorded on videotape and played back for further processing after the experiment.

### Histology

Sural nerves from control and experimental 30-day-old rats (4 per nutritional paradigm) were dissected and prepared for histological examination. Nerve samples (2-3 mm long) were fixed by using the Karnovsky solution (paraformaldehyde, 1%; glutaraldehyde, 2.5% and sodium cacodylate, 0.2M, pH: 7.5; Karnovsky, 1965), washed with sodium cacodylate buffer (pH: 7.4-7.6) and post-fixed in cold with osmium tetroxide (1%). The samples were dehydrated through successive ethanol solutions (70, 80, 90, 95, 100%) and embedded in EPON 812. The samples were transversally

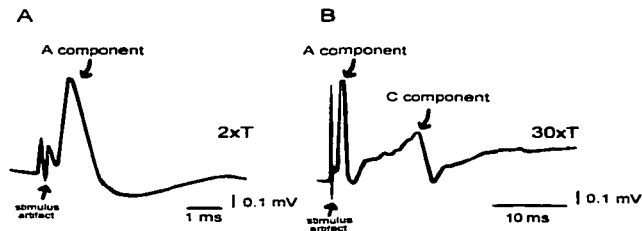


FIGURE 1 Components of the compound action potential (CAP) recorded in a control sural nerve of 30-day-old control rat. A. Low-intensity electrical pulses (2 $\times$ ) evokes a fast component (latency:  $-0.6$  ms) in the CAP which is associated to activation of group A-afferent fibers in the nerve. B. High-intensity stimulation (30 $\times$ ) evokes a second, long lasting potential (latency:  $\sim 8$  ms) which probably is due to excitation of  $\Delta$  or C fibers in the sural nerve. Each trace corresponds to the average of 16 individual recordings. Note different time scale in B.

130

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

sectioned (1–2  $\mu\text{m}$ ) and stained with toluidine blue (0.5% in 4% sodium borate). One selected nerve section was photographed and amplified to measure the transversal area and the number

of axons in the nerve. In addition, it was determined the transversal area, diameter and myelin thickness of each individual axon in the nerve.

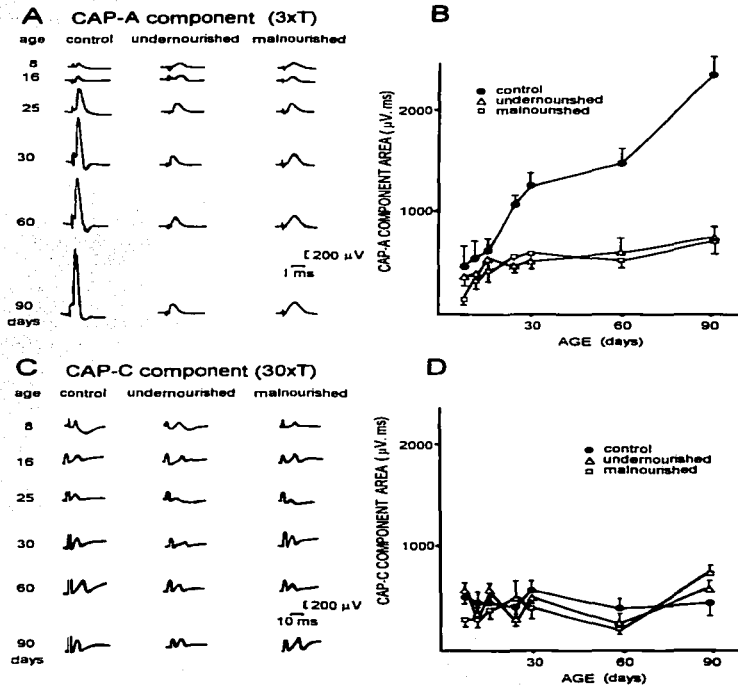


FIGURE 2 Effect of undernutrition or malnutrition on the postnatal development of the CAP-components evoked in sensory sural nerves. Traces in A and C: Averaged recordings ( $n = 16$  traces) of A and C components in the CAP evoked by low- and high-intensity stimulation (3 $\times$  and 30 $\times$ , respectively) applied to sural nerves of control, undernourished or malnourished rats at different postnatal ages (as indicated). Note different time scale in C. B and D: Graphs illustrating the area (expressed as  $\mu\text{V.ms}$ ) of the CAP A and C components recorded in control and experimental sural nerves at different postnatal ages (as indicated in the abscissa).

### Statistical Analysis

Differences between control and experimental data were inferred from single ANOVA and Tukey tests. The data illustrated in graphs are the averaged values obtained from 8 to 10 nerves and bars indicate standard error (SE).

## RESULTS

### Components of the Compound Action Potential

Single electrical pulses applied to one end of the sural nerve evokes the excitation of afferent fibers and the response can be recorded on the other nerve end as a CAP. The magnitude and number of components in the CAP depends on the number and physiological properties of the afferent fibers excited by the stimuli applied (i.e. threshold and/or conduction velocity). Figure 1 illustrates typical recordings of the CAP evoked in the sural nerve of one control rat (30-day-old) at two different stimulus strengths. Low intensity stimulation (2 $\times$ ; Fig. 1A) usually generates an early CAP-component (onset latency: 0.1 ms) which is associated to activation of low-threshold, fast-conducting group A afferents (component A; see: Patton, 1965; Rogart and Ritchie, 1977). By increasing the stimulus strength (up to 30 $\times$ ; see Fig. 1B), it is also possible to evoke a second, long-lasting component which seems to be due to excitation of A $\delta$  or C afferent fibers (C component; see: Patton, 1965; Rogart and Ritchie, 1977).

### Amplitude and Area of the CAP

Figure 2 shows the changes in amplitude and area of the A and C components in the CAP evoked in sural nerves of control and experimental animals at different postnatal ages with two intensities of stimulation (2-3 $\times$  and 30 $\times$ , respectively). At 8-16 postnatal days, the

A-component of the CAP evoked in control nerves with a low-intensity stimulus is practically similar in amplitude (Fig. 2A) and area (Fig. 2B) than those obtained in undernourished or malnourished nerves (see Table I). From 25 to 90 postnatal days the CAP-A component of control nerves increased exponentially in amplitude and area (Fig. 2A,B), indicating a possible activation of afferent fibers that became gradually excitable with age. In contrast, the same component recorded in undernourished and malnourished nerves showed no increments in amplitude or area during the postnatal growth of animals and it was significantly smaller than the control CAP A-component (50-300% lower than control; ANOVA,  $p < 0.001$ ; see Fig. 2A,B and Table I).

On the other hand, the high-threshold, slow-component evoked in the CAP of control nerves was not significantly different from those recorded in undernourished and malnourished nerves and it showed no appreciable increment in amplitude or area during the postnatal development of the rat (Fig. 2C,D; see Table I).

Our observations may indicate that the number of myelinated axons activated in nerves of perinatal undernourished and malnourished animals by a relative low-strength stimulus, but supra-maximal to group A afferent fibers (2-37), was minor than the number of axons excited in control nerves. By contrast, high intensity stimulation activated an equivalent number of A $\delta$  or probably C axons in both control and experimental nerves. The latter could imply that perinatal undernutrition and malnutrition may induce a notable reduction in the capability of a subset of group A, but not A $\delta$  or C afferent fibers to generate action potentials during the postnatal development of the rat.

### Electrical Threshold

In order to explain the small amplitude and area of the PAC A-component recorded in

132

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

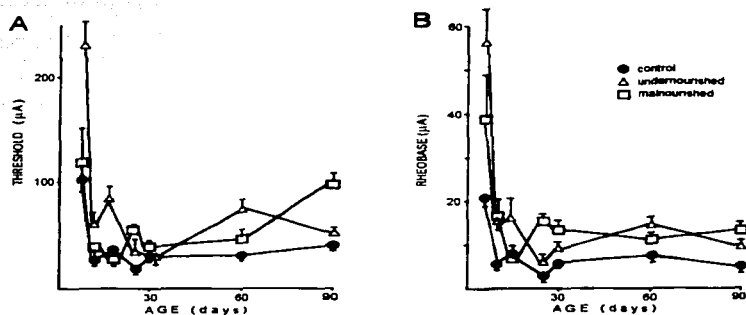


FIGURE 3 Effect of perinatal restrictions in food intake on the (A) electrical threshold ( $\mu\text{A}$ ) and (B) rheobase ( $\mu\text{A}$ ) of the CAP-A component evoked in sural nerves of control (closed circles), undernourished (open triangles) and malnourished (open squares) animals at several postnatal ages (as indicated in the abscissa).

undernourished and malnourished nerves, a possible reduction in the excitability of the afferent fibers was assumed. This possibility was analyzed by determining the electrical threshold and rheobase of the fast component in the CAP evoked in control and experimental animals.

As it is shown in Fig. 3A, the amount of electrical current needed to activate the most excitable axons in nerves of control and experimental animals was higher (2–3 times) at early postnatal ages (until 8 days) than in subsequent ages (Table I). At 12–18 days the electrical threshold of the fibers suddenly decayed acquiring values that were very similar to those obtained in nerves of adult animals (see Fig. 3A and Table I). If we consider a possible inverse linear relationship between the diameter of the fibers and their electrical threshold (i.e. thick fibers—lowest threshold; see Patton, 1965; Rogart and Ritchie, 1977), we can assume that during the postnatal growth the threshold of the afferent fibers decreased while its thickness increased.

The electrical threshold of the most excitable fibers in the sural nerve of undernourished and malnourished animals was relatively higher, but not statistically different (ANOVA  $p > 0.05$ ) than the current required to excite the same type of fibers in control nerves at all postnatal ages (Fig. 3A and Table I). By contrast, the electrical threshold of the most excitable fibers producing the slow CAP-C component in experimental nerves was not statistically different from that of control nerves (Table II).

A better estimate of nerve excitability is the rheobase value (Noble and Stein, 1966; Aidley, 1989). It indicates the minimal electrical charge per unit of time needed to evoke an action potential in the nerve. Figure 3B and Table I showed the averaged rheobase values calculated from the control and experimental strength-duration curves. As it can be seen the rheobase values for the CAP A component evoked in malnourished and undernourished nerves were significantly higher than those values obtained for control nerves at practically all postnatal ages (except at 12 and 16 days; ANOVA  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively). Our results could



indicate that severe perinatal food restrictions produced a considerable reduction in the diameter of group A fibers in the developing sural nerve, instead of A $\delta$  or C fibers which seems to had electrical threshold of similar magnitude in control and experimental nerves (see Table II; however see below).

### Absolute Refractory Period

In order to characterize the possible effect of perinatal food restrictions on the capability of group A fibers to regenerate action potentials, we decided to analyze the absolute refractory period of the CAP evoked in the sural nerve of control and experimental animals. The results show that practically there are no differences between the absolute refractory period of the CAP evoked in control and malnourished or undernourished nerves at all postnatal ages (Fig. 4A and Table I). The latter could suggest that the capability to regenerate action potentials of group A fibers in the sural nerve is practically the same regardless of the animal nutritional condition.

### Conduction Velocity

Previous studies have shown that malnourishment induces a significant decrease in conduction velocity of the compound action potential recorded in the sciatic nerve (Sima and Jankowska, 1976; Oldfors and Ullman, 1980), which subsequently was associated to an inadequate myelination of axons (Wiggins, 1982). In order to analyze such effects, we determined in this study the conduction velocity of the fastest axons producing A and C components in the PAC during the postnatal development of control and experimental sural nerves.

From 8 to 16 postnatal days, the maximal conduction velocity of the CAP-A component evoked in control nerves was similar to that of undernourished or malnourished nerves (Fig. 4B

and Table I). Subsequently, from 25 to 60 postnatal days, the maximal conduction velocity of the fastest fibers in control nerves, increased exponentially (from  $19.4 \pm 1.8$  to  $35.5 \pm 1.2$  m/s; Fig. 4B and Table I). This increase was associated to activation of fast myelinated afferent fibers (see Patton, 1965) and it is slightly faster ( $\sim 10\%$ ) than the CAP recorded in experimental nerves (see Fig. 4B; ANOVA  $p < 0.01$ ). At 90 postnatal day there was not significant differences between control and experimental nerves (ANOVA,  $p > 0.05$ , Table I). By contrast, the conduction velocity of the CAP C-component of control nerves was practically similar to that of undernourished and malnourished nerves from different postnatal ages (around 0.5–0.8 m/s; Table II). This may suggest that perinatal food restrictions could induce a retardation in the propagation of the action potential through myelinated, but not unmyelinated afferent fibers of the sural nerve by reducing or delaying the normal myelination process of the sensory axons along the postnatal development of the rat.

### Histological Analysis

In order to determine whether the reduction in amplitude and area of the CAP-A component is associated with changes in morphology of nerves and axons, the number and general morphological characteristics of myelinated fibers in the sural nerve of control and experimental 30-day-old rats were analyzed. As shown in Fig. 5B and Table III, practically there are no differences in number, transverse area and diameter of the axons located in undernourished or malnourished sural nerves, compared with those of control nerves. However, the myelin sheath thickness of axons (undernourished: 82.7% and malnourished: 86.2%) and the whole transversal area of experimental nerves (undernourished: 62.7% and malnourished: 57.8%) shows significant decrements as compared with those of control nerves ( $p < 0.01$ , see Fig. 5A,B and

134

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLE II Electrophysiological characteristics of the C component in the CAP evoked in sural nerves of control (C), undernourished (U), and malnourished animals at different postnatal ages. (Average and standard error values are showed. The number of nerves used per age and food condition are shown in parenthesis and asterisks indicate the confidence ranges for the statistical differences between control and experimental procedures (single ANOVA and Tukey tests: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ))

Age (days)	Area ( $\mu Vms$ )			Threshold ( $\mu A$ )			Conduction velocity (m/s)		
	C	U	M	C	U	M	C	U	M
8	5215 ± 377 (8)	5655 ± 208 (8)	2892 ± 261 (8)	1390 ± 132 (8)	1843 ± 155 (8)	266 ± 66 (8)	0.56 ± 0.04 (8)	0.62 ± 0.05 (8)	0.62 ± 0.05 (8)
12	4611 ± 915 (10)	3154 ± 518 (10)	3215 ± 923 (9)	3118 ± 299 (10)	3320 ± 418 (10)	2863 ± 274 (8)	0.56 ± 0.02 (10)	0.6 ± 0.05 (10)	0.6 ± 0.05 (8)
16	4710 ± 915 (10)	5620 ± 654 (8)	4091 ± 1046 (8)	2867 ± 577 (10)	1277 ± 162 (8)	4933 ± 786 (8)	0.66 ± 0.03 (10)	0.71 ± 0.03 (8)	0.71 ± 0.03 (8)
25	4365 ± 515 (8)	3290 ± 472 (8)	5192 ± 196 (8)	1090 ± 147 (8)	1650 ± 478 (8)	9475 ± 669 (8)	0.62 ± 0.08 (8)	0.57 ± 0.01 (8)	0.57 ± 0.01 (8)
30	5260 ± 1192 (8)	5319 ± 576 (10)	4543 ± 1322 (8)	2130 ± 353 (8)	1665 ± 118 (10)	1160 ± 199 (8)	0.6 ± 0.04 (8)	0.72 ± 0.05 (10)	0.72 ± 0.05 (8)
60	4093 ± 1191 (8)	2722 ± 130 (8)	2415 ± 167 (8)	1451 ± 201 (8)	2650 ± 115 (8)	156 ± 117 (8)	0.6 ± 0.05 (8)	0.5 ± 0.05 (8)	0.65 ± 0.05 (8)
90	4768 ± 1371 (8)	5985 ± 299 (8)	7505 ± 102 (8)	1115 ± 346 (8)	2125 ± 529 (8)	2495 ± 731 (8)	0.7 ± 0.6 (8)	0.69 ± 0.01 (8)	0.83 ± 0.06 (8)

135

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

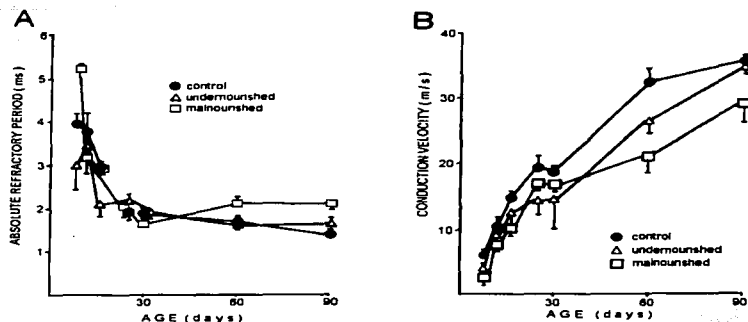


FIGURE 4. Effect of perinatal food restrictions on (A) absolute refractory period (ms) and (B) conduction velocity (m/s) of the CAP-A component evoked in control (closed circles), undernourished (open triangles) and malnourished (open squares) sural nerves at different postnatal ages (as indicated in the abscissa).

Table III). This evidence indicates that perinatal food deficiencies in quantity and/or quality induce severe alterations in axon myelin formation (see also: Clos and Legrand, 1970; Hedley-White and Meuser, 1971) and strong structural changes (shrinkage of axons) in peripheral nerves.

## DISCUSSION

The evidence obtained in this study illustrates the alterations produced by perinatal food deficiencies in quantity (undernutrition) or quality (malnutrition), on the generation and propagation of the CAP evoked in peripheral sural nerves during the postnatal development of the rat. Compared to control nerves, the most striking difference observed was a remarkable reduction in amplitude and area of the A component in the CAP recorded in undernourished or malnourished nerves. It could be argued that such a reduction in CAP's amplitude or area was associated to inadequate and inconsistent recording conditions from one

experiment to the next. This possibility was partially cancelled in our study by obtaining electrodes with resistance values between 8 and 10 k $\Omega$  in all recording sessions. In addition, the electrode resistance, maximal amplitude and threshold of the CAP were systematically checked during the whole period of the experimental sessions. Furthermore, the fact that only the A component, but not the C component in the CAP, recorded in the same nerves and experimental conditions, was affected by perinatal food deficiencies is not compatible with the possibility of inconsistency of experimental recording conditions. It thus seems reasonable to establish that the small amplitude and area of the CAP-A component observed in undernourished or malnourished nerves results from factors associated to the experimental dietary paradigms but not by inadequate recording conditions.

The reduction in amplitude and area of the A component in the CAP would be explained if we considered several possibilities, among others to: (1) A substantial reduction in number of afferent axons in the sural nerve of experimental animals.

136

TRIPES CON  
FALLA DE ORIGEN

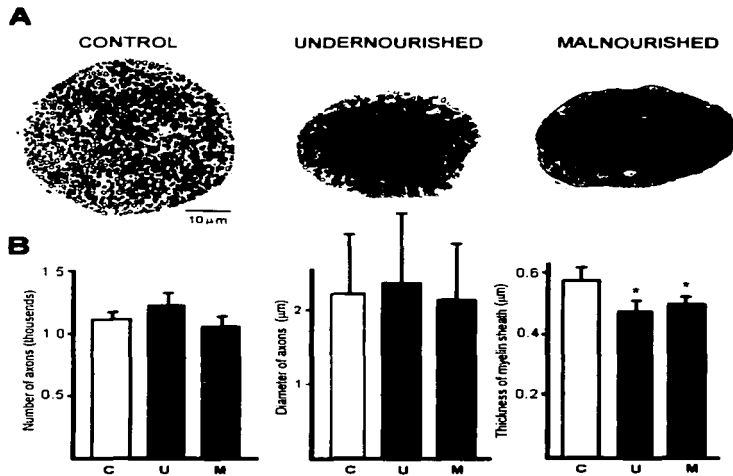


FIGURE 5 Effect of perinatal restriction in food intake on the morphology of 30-day-old sural nerves and axons. A. Photographs of transversal sections of control, undernourished and malnourished sural nerves. B. Morphological characteristics of control (C), undernourished (U) and malnourished (M) axons in 30-day-old sural nerves ( $n = 4$ ).

Our histological data indicated that control, undernourished, and malnourished nerves of 30-day-old rats had practically the same number of fibers. This result is in agreement with those reported by Sima (1974a) in the sciatic nerve and refutes the thesis that a reduction in the number of afferent fibers is responsible for the decrement in area or amplitude of the CAP-A component evoked in experimental nerves. (2) A remarkable reduction in afferent fiber excitability. This possibility was analyzed in the present study by determining the threshold and rheobase values of control and experimental nerves. The data obtained indicates that relatively large current pulses are needed to activate the most excitable fibers in undernourished and malnourished nerves than in control nerves. Such a

condition is indicative of considerable reduction in the excitability of group A afferent fibers. It could be argued that the decrement in afferent fiber excitability is related to changes in the axonal membrane, affecting the ionic conductance of the fibers and their capability to generate action potentials (i.e. reduction in the number of sodium channels per area of axon membrane; Vabnick *et al.*, 1996). The absence of significant differences in the absolute refractory period of the CAP-A component evoked in control and experimental nerves would indicate that the afferent fibers maintain their membrane conductance and ability to regenerate action potentials regardless of animal's nutritional condition.

A further explanation for the decreased excitability of experimental afferent fibers is

TABLE III General histological characteristics of sural nerves of 30-day-old control (C), undernourished (U) and malnourished (M) animals. (Average and standard error values are showed. The number of nerves per food condition is 4. Asterisks indicate the confidence ranges for the statistical differences between control and experimental procedures (single ANOVA and Tukey tests: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )

	C	U	M
Nerve area ( $\mu\text{m}^2$ )	36,813.8 $\pm$ 4362.1	23090.3 $\pm$ 845.8**	21286.2 $\pm$ 682.3**
Number of axons (n)	1103.2 $\pm$ 34.3	1230.2 $\pm$ 83.9	1045 $\pm$ 72.2
Axon area ( $\mu\text{m}^2$ )	4.31 $\pm$ 2.87	5.02 $\pm$ 3.67	4.03 $\pm$ 3.01
Axon diameter ( $\mu\text{m}$ )	2.2 $\pm$ 0.78	2.35 $\pm$ 0.9	2.12 $\pm$ 0.78
Myelin sheath thickness ( $\mu\text{m}$ )	0.58 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.03*	0.50 $\pm$ 0.04*

related to a possible reduction in the axon diameter or myelin sheath thickness (see Patton, 1965; Aidley, 1989). The histological analyses showed that the diameter of the experimental axons was similar to that measured in control axons (Sima, 1974b) but there was a significant reduction in the myelin sheath thickness of undernourished and malnourished axons. This could partially explain the decrements observed in excitability and conduction velocity of the CAP-A component evoked in experimental nerves. These results are in agreement with previous studies indicating the occurrence of an inadequate formation of the myelin sheath in axons of neonate and young rats (Clos and Legrand, 1970; Hedley-White and Meuser, 1971; Sima, 1974b). In this regard, it should be mentioned that moderate reduction in the axon myelin sheath induces drastic changes in the structure and morphology of Ranvier's node (Bowe *et al.*, 1994; Ritchie, 1995), attenuating the propagation of action potentials through the afferent fibers (see: Waxman, 1977; Vabnick *et al.*, 1997). This possibility needs to be further evaluated by using experimental approaches other than those implemented in this study.

In summary, our results indicate that severe perinatal food restrictions, in quantity and/or quality, produce considerable alterations in the generation and propagation of action potentials in myelinated, but not unmyelinated sensory afferent fibers of neonates and young animals and such effects could affect the transmission of sensory information from peripheral skin

receptors to the spinal cord and central nervous system in the developing rat.

#### Acknowledgements

We like to thank Dr Roberto Prado for his criticism and useful language corrections of the manuscript and to José Baltazar for his technical assistance in the histology of nerves. This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant 26342-N to I. Jiménez and grant DGAPA-UNAM IN-208597 to L. Cintra, and by Sistema Nacional de Investigadores, México.

#### References

- Aidley, D.J. (1989) *The Physiology of Excitable Cells* (Cambridge University Press, Cambridge), pp 30-53.
- Bedi, K.S. (1994) "Undernutrition of rats during early life does not affect the total number of cortical neurones", *The Journal of Comparative Neurology* 324, 596-602.
- Bowe, C.M., Johanson, C.S., Hildebrand, C. and Evans, N.H. (1994) "Functional properties and nodal spacing of myelinated fibers in developing rat mental and sural nerves", *Developmental Brain Research* 79, 186-194.
- Bronzino, J.D., Morgane, J.P., Forbes, W.B., Stern, W.C. and Resnick, O. (1975) "Ontogeny of visual evoked responses in rats protein-malnourished during development", *Biological Psychiatry* 10, 175-184.
- Chow, B.F. and Lee, C.J. (1964) "Effects of dietary restriction of pregnant rats on body weight gain of the offspring", *Journal of Nutrition* 82, 10-18.
- Clos, J. and Legrand, J. (1970) "Influence de la déficience thyroïdienne et de la sous-alimentation sur la croissance et la myélinisation des fibres nerveuses du nerf sciatique chez le jeune rat blanc. Étude au microscope électronique", *Brain Research* 22, 285-297.

138

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Comblath, D.R. and Brown, M.J. (1988) "Influence of malnutrition on developing rat peripheral nerves", *Experimental Neurology* 99, 403-411.
- Frankova, S. and Barnes, R.H. (1968) "Effect of malnutrition in early life on avoidance conditioning and behavior of adult rats", *Journal of Nutrition* 96, 485-493.
- Hedley-White, E.T. and Meuser, C.S. (1971) "The effect of undernutrition on myelination of rat sciatic nerve", *Laboratory Investigation* 24, 156-161.
- Karnovsky, M.J. (1965) "A. formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy", *Journal of Cell Biology* 27, 137A-138A.
- Kawaii, S., Nakamura, S. and Matsuo, T. (1989) "Effects of early undernutrition on brainstem auditory evoked potentials in weanling rats", *Biology of the Neonate* 55, 268-274.
- Krigman, M.R. and Hogan, E.L. (1976) "Undernutrition in the developing rat: effect upon myelination", *Brain Research* 107, 239-255.
- Levitsky, D.A. and Barnes, R.H. (1970) "Effect of early malnutrition on the reaction of adult rats to aversive stimuli", *Nature* 225, 468-469.
- Liguori, R. and Trojaborg, W. (1990) "Are there motor fibers in the sural nerve?", *Muscle and Nerve* 13, 12-15.
- Lynch, A. (1976) "Passive avoidance behavior and response thresholds in adult male rats after early postnatal undernutrition", *Physiology and Behaviour* 16, 27-32.
- Morgane, P., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E. and Resnick, O. (1978) "The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2, 137-230.
- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R.J., Bronzino, J., Tonkiss, J. and Galler, J.R. (1992) "Malnutrition and the developing central nervous system", In: Isaacson, R.L. and Jensen, K.F., eds, *The Vulnerable Brain and Environmental Risks Malnutrition and Hazard Assessment*, (Plenum Press, New York) Vol. 1, pp 3-44.
- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R.J., Bronzino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. and Galler, J.R. (1993) "Prenatal malnutrition and the development of the brain", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 17, 91-128.
- Nakanishi, T. and Forbes, N. (1970) "Motor fibers in rat sural nerve", *Experimental Neurology* 26, 433-435.
- Noble, D. and Stein, R.B. (1966) "The threshold conditions for initiation of action potentials by excitable cells", *Journal of Physiology* 187, 129-162.
- Oldfors, A. and Ullman, M. (1980) "Motor nerve conduction velocity and nerve fiber diameter in experimental protein deprivation", *Acta Neuropathologica* 51, 215-221.
- Patton, T.C. (1965) "Special properties of nerve trunks and tracts", In: Ruch, T.C., Patton, H.D., Woodbury, J. and Towe, A., eds, *Physiology and Biophysics* (W.B. Saunders Company, Philadelphia), pp 73-95.
- Popesko, T., Rajtova, V. and Horak, J. (1990) A colour atlas of the anatomy of small laboratory animals: rat, mouse and golden hamster (Wolfe Publishing Ltd, London) Vol. 2.
- Quirk, G., Mejia, W., Hesse, H. and Su, H. (1995) "Early malnutrition followed by nutritional restoration lowers the conduction velocity and excitability of the corticospinal tract", *Brain Research* 670, 277-282.
- Rogart, R.B. and Ritchie, J.M. (1977) "Physiological basis of conduction in myelinated nerve fibers", In: Morell, P., ed. *Myelin* (Plenum Press, New York), pp 117-159.
- Ritchie, J.M. (1995) "Physiology of axons", In: Waxman, S.G., Kocsis, J.D. and Stys, P.K., eds, *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology* (Oxford University Press, London), pp 328-340.
- Segura, B., Gutierrez, A.L., Guadarrama, J.C. and Jimenez, I. (1996) "Effect of malnutrition on the postnatal development of the compound action potential in the rat", *Society for Neuroscience Abstracts* 22, 1221.
- Segura, B., Gutierrez, A.L., Guadarrama, J.C., Cintra, L. and Jimenez, I. (1997) "Comparison of effects produced by early undernutrition and malnutrition on the compound action potential of sural nerves in the developing rat", *Society for Neuroscience Abstracts* 23, 1155.
- Segura, B., Pratz, G., Guadarrama, J.C., Cintra, L. and Jimenez, I. (1999) "Effects of undernutrition and protein malnutrition on the slow C component of the compound action potential of peripheral cutaneous nerves in developing rats", *Society for Neuroscience Abstracts* 25, 2019.
- Simá, A. (1974a) "Studies on fibre size in developing sciatic nerve and spinal roots in normal, undernourished, and rehabilitated rats", *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum* 406, 3-55.
- Simá, A. (1974b) "Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibres of ventral and dorsal roots and optic nerve in normal, undernourished and rehabilitated rats. An ultrastructural morphometric study", *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum* 410, 3-38.
- Simá, A. and Jankowska, E. (1976) "Sensory nerve conduction velocity as correlated to fibre size in experimental undernutrition in the rat", *Neuropathology and Applied Neurobiology* 1, 31-37.
- Smart, J. and Dobbing, J. (1971) "Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat", *Brain Research* 33, 303-314.
- Stys, P.K. (1993) "Suction electrode recording from nerves and fiber tracts. A guide for in vitro studies in vertebrate neurobiology", In: Kettenman, H. and Granty, R., eds, *Practical Electrophysiological Methods* (Wiley-Liss, New York), pp 189-194.
- Stys, P.K. and Kocsis, J.D. (1995) "Electrophysiological approaches to the study of axons", In: Waxman, S.G., Kocsis, J.D. and Stys, P.K., eds, *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology* (Oxford University Press, Oxford), pp 328-340.
- Stys, P.K., Ranson, B.R. and Waxman, S.G. (1991) "Compound action potential of nerve recorded by suction electrode: a theoretical and experimental analysis", *Brain Research* 546, 18-32.
- Vabnick, I., Novakovic, S.D., Levinson, S.R., Schachner, M. and Shrager, P. (1996) "The clustering of axonal sodium channels during development of the peripheral nervous system", *The Journal of Neuroscience* 16, 4914-4922.
- Vabnick, I., Messing, A., Chiu, S.Y., Levinson, S.R., Schachner, M., Roder, J., Chumel, L., Novakovic, S. and Shrager, P. (1997) "Sodium channel distribution in axons of

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

hypomyelinated and MAG null mutant mice", *Journal of Neuroscience Research* 50, 321-336.

Waxman, S.G. (1977) "Conduction in myelinated, unmyelinated, and demyelinated fibers", *Archives in Neurology* 34, 585-589.

Wiggins, R. (1982) "Myelin development and nutritional insufficiency", *Brain Research Reviews* 4, 151-175.

Willis, W.D. and Cogeshall, R.E. (1978) *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*, (Plenum Press, New York), pp 9-128.

TESIS COM  
FALLA DE ORIGEN

- 2.- Pittendrigh C. Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. *Ann Rev Physiol.* 55: 15-54. 1993.
- 3.- Rusak B, Zucker I. Biological rhythms and animal behavior. *Animal Rev Psychol.* 26: 137-171. 1975.
- 4.- Stephan FK. Limits of entrainment to periodic feeding in rats with suprachiasmatic lesions. *J Comp Physiol.* 143: 410-410. 1981.
- 5.- Stephan FK. Resetting of a feeding-entrainable circadian clock in the rat. *Physiol Behav.* 52: 985-995. 1992.
- 16.- Suda M, Saito M. Coordinative regulation of feeding behavior and metabolism by a circadian timing system. En: *Biological Rhythms and their Central Mechanism.* Suda M, Hayashi O, Nakagawa H. (Eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 1979. pp 63-271.
- 17.- Yoshikawa T, Honma S, Honma KI. Effects of restricted daily feeding on neuropeptide Y release in the rat paraventricular nucleus. *Am J Physiol.* 270 (Endocrinol Metabol. 33): E589-595. 1996.

BASES NEUROBIOLÓGICAS Y ECOLÓGICAS DE LA CONDUCTA  
Martínez-Gómez M y Velázquez-Moctezuma J (Coord.)  
Ed. UAT, UAM, UV, UNAM  
México, 1998

# Desarrollo ontogénico de las propiedades funcionales de músculos esqueléticos y de nervios periféricos

Bertha Segura Alegria e Ismael Jiménez Estrada.

Dpto. de Biología, ENEP Iztacala, UNAM  
Dpto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV,  
IPN.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCIÓN

La inmensa variedad de pautas conductuales que manifiestan los animales adultos es el resultado de la estrecha relación que sostiene el Sistema Nervioso Central con los distintos órganos efectores, sean estos glándulas endocrinas o músculos esqueléticos



La notable relación que guarda el Sistema Nervioso con los músculos esqueléticos es producto de una larga serie de procesos que ocurren tanto a nivel central (por ejemplo: la formación de circuitos neuronales que generan patrones motores) como periférico (formación de uniones neuromusculares; maduración de fibras musculares y de receptores sensoriales, etc.) en distintos estadios del desarrollo de los animales.

El presente capítulo tiene como objetivo el describir someramente algunas de las etapas del desarrollo ontogénico de los músculos esqueléticos y de los nervios periféricos, poniendo especial énfasis en la manifestación de las propiedades funcionales de ambas estructuras.

## DESARROLLO ONTOGÉNICO DE LAS PROPIEDADES CONTRÁCTILES DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

### A. Características generales.

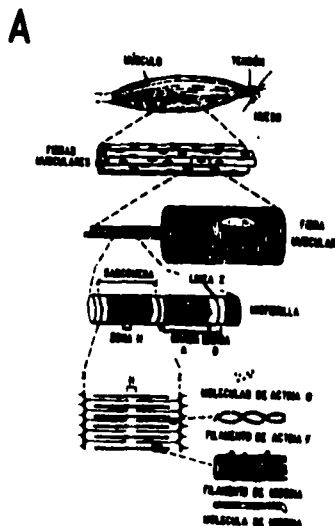
En los animales adultos, los músculos esqueléticos están constituidos por células alargadas multinucleadas, llamadas fibras musculares, cuyo diámetro varía de 10 a 100  $\mu\text{m}$  y su longitud también es variable, esto es, tienen desde unos cuantos milímetros hasta varios centímetros, dependiendo de la articulación que muevan o del tamaño corporal del animal. Las fibras musculares tienen forma casi cilíndrica y cada una de ellas está rodeada por una membrana llamada sarcolema, que las separa del líquido intersticial. Sus extremos suelen fusionarse con el tejido, relativamente rígido, que constituye los tendones (13; Figura 1A).

Los músculos están rodeados por una capa de tejido conectivo conocida como epimisio y pueden dividirse en fascículos que contienen un número variable de fibras musculares que están envueltas por una capa de tejido conectivo, conocida como perimisio. A su vez, cada fibra muscular es rodeada por tejido conectivo, denominado endomisio, el cual no debe confundirse con el sarcolema (Figura 1B).

Cada fibra muscular está conformada por una serie de subunidades, denominadas miofibrillas, las cuales poseen un diámetro aproximado de 1  $\mu\text{m}$  y tienen una longitud similar a la de la fibra muscular. La forma de las miofibrillas es esencialmente cilíndrica y cada una de ellas se encuentra rodeada por un amplio sistema de membranas, denominado retículo sarcoplásmico (RS). Tanto las fibras musculares como las miofibrillas presentan un patrón de estríación característico, con bandas claras (isotrópicas o bandas I) y bandas oscuras (anisotrópicas o bandas A) que se repiten en forma alternada a todo lo largo de la célula muscular (Figura 1A).

Las miofibrillas están compuestas primordialmente por proteínas filamentosas, denominadas actina y miosina, quienes constituyen el aparato contráctil del músculo esquelético. Además, las miofibrillas se encuentran rodeadas por el citoplasma de la fibra muscular (sarcolema), que contiene mitocondrias en abundancia, gránulos de glucógeno y lípidos (Figura 1A).

Los músculos poseen una excelente irrigación sanguínea, con vasos capilares que se anastomosan entre las miofibrillas y conforman una fina red capilar que permite la adecuada oxigenación y el aporte apropiado de compuestos energéticos para el buen funcionamiento de todas las fibras musculares (Figura 1B).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

B

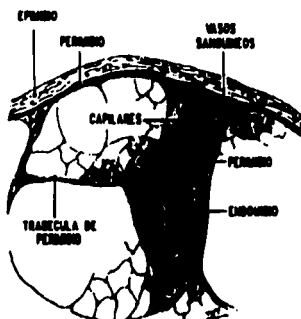


Figura 1.- A: Organización estructural del músculo esquelético (Adaptado de 5). B: Corte transversal de un músculo esquelético (Tomado de 21).

143

Confluyen en el músculo uno o dos haces de fibras nerviosas de índole sensitivo y motor. Entre los axones nerviosos sensitivos se incluyen aquellos que inervan los husos musculares (receptores sensoriales que detectan los cambios en la longitud del músculo), los que inervan a los órganos de Golgi (receptores localizados en los tendones que indican los cambios de tensión muscular) y algunas terminaciones nerviosas libres, asociadas a sensaciones dolorosas (Figura 2). En los mamíferos adultos, la inervación motora de los músculos se lleva a cabo mediante fibras nerviosas provenientes de motoneuronas espinales gamma que contactan con las fibras musculares que están dentro del huso muscular (intrafusales) y por axones nerviosos de motoneuronas alfa que inervan fibras musculares extrafusales (Figura 2). En el animal adulto, cada una de las motoneuronas alfa inerva un número variable de fibras musculares extrafusales, entre 5 y 10 en los músculos extraoculares hasta el orden de miles en los músculos de las extremidades (13). Por lo tanto, una unidad motora está constituida por todas las fibras musculares que son inervadas por una sola motoneurona espinal y es la unidad funcional fundamental en la relación sistema nervioso-músculo esquelético.

TESIS COM  
PALLA DE ORO

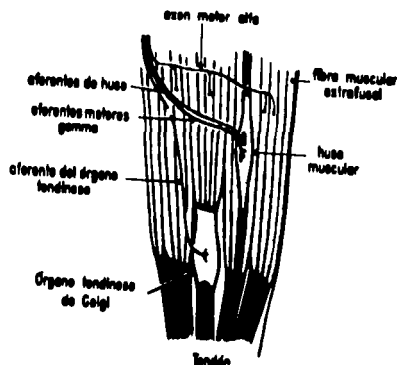


Figura 2.- Vías nerviosas sensitivas y motoras que confluyen en el músculo esquelético (Adaptado de 19).

### B. Tipos de fibras musculares

En el mamífero adulto se han descrito varios tipos de fibras musculares, de las que resaltan dos de ellas: las de sacudida simple o tónicas, que responden a la actividad nerviosa con una sacudida rápida, y las fibras lentas o tónicas, que responden a los estímulos nerviosos con contracciones lentas y sostenidas. Ambos tipos de fibras se encuentran presentes en todos los músculos, pero la proporción de ellas varía de acuerdo a la función que desempeña cada músculo en particular; así por ejemplo, los músculos tibial y plantar (flexores de las articulaciones de la rodilla y del tobillo, respectivamente) presentan una mayor proporción de fibras rápidas; mientras que el soleo (músculo extensor del tobillo) presenta un mayor número de fibras de contracción tónica lenta que de fibras rápidas (14).

De acuerdo a las diferencias metabólicas e inmunohistoquímicas que presentan, se distinguen los siguientes subtipos de fibras musculares (18):

**Fibras musculares tónicas:** Se caracterizan por desarrollar una contracción muy lenta. Se encuentran en los músculos posturales de los anfibios, los reptiles y las aves, así como en los mamíferos. Las fibras tónicas por lo común no generan potenciales de acción y su excitación se efectúa mediante la activación de múltiples placas terminales o uniones sinápticas que realiza el axón nervioso a lo largo de toda la fibra muscular. Una de las características bioquímicas de las fibras musculares tónicas es la de que la cabeza de las

ulas de miosina se desplaza muy lentamente al contactar con la molécula tina, lo cual mantiene de manera prolongada a la tensión isométrica(1; más adelante).

Las **fibras lentas**: Son fibras musculares de contracción lenta, resistentes a la fatiga y generan escasa fuerza durante la sacudida simple. Se localizan en músculos posturales de los mamíferos. Presentan una o muy pocas uniones neuromusculares, usualmente de un solo axón motor y son capaces de generar acciones de acción todo o nada. Lo mismo que las fibras musculares tónicas, las fibras de contracción física y lenta ayudan a mantener la postura y ayudan en la ejecución de movimientos lentos y repetidos. El hecho de que las fibras sean poco fatigables, podría deberse a que poseen en su plasma un número considerable de mitocondrias y a que consumen ATP en proporciones relativamente bajas (8, 17). Estas fibras musculares también se caracterizan por el color rojizo que adquieren por una acumulación considerable de oxígeno en la mioglobina.

Las **fibras rápidas glucolíticas**: Este tipo de fibras musculares se contraen y se fatigan rápidamente. La contracción física rápida es atribuida directamente al movimiento rápido de la cabeza de las moléculas de miosina. En general, los animales utilizan este tipo de fibras para realizar movimientos posturales rápidos (por ejemplo, para realizar movimientos). El utilizado por este tipo de fibras musculares es producido mediante la hidrólisis; contienen pocas mitocondrias y durante la sacudida simple generan hasta 100 veces mayor tensión o fuerza que las fibras físicas lentas.

Las **fibras oxidativas**: Estas fibras musculares son de contracción rápida, se fatigan lentamente. Poseen un gran número de mitocondrias y son capaces de producir ATP mediante fosforilación oxidativa. Estas fibras están especializadas en realizar movimientos repetitivos pero rápidos. Durante la actividad repetitiva, estas fibras desarrollan más fuerza que las fibras de tipo rápido glucolíticas y que las físicas lentas.

También se ha propuesto una clasificación de las fibras musculares de acuerdo a las características inmuno-histoquímicas de las moléculas de miosina que contienen (29):

Las **fibras lentas del tipo I**. Son fibras musculares que contienen exclusivamente moléculas de miosina "lenta", este tipo corresponde a las fibras físicas lentas.

Las **fibras rápidas del tipo II**. Las cuales se subdividen en: Tipo IIA en las que predomina la miosina "rápida", pero también poseen miosina lenta (fibras

oxidativas), y las del Tipo IIB que contienen exclusivamente miosina rápida (fibras rápidas glucolíticas).

### C. Propiedades mecánicas de los músculos esqueléticos

Existen dos tipos de contracciones musculares, la isométrica y la isotónica. La contracción isométrica es aquella en la que el músculo desarrolla tensión pero no cambia de longitud y la contracción isotónica se caracteriza porque el músculo modifica su longitud pero mantiene constante la tensión (1).

La contracción isotónica es efectuada por músculos que participan en el movimiento de las articulaciones, mientras que la contracción isométrica la realizan los músculos que se encargan de mantener las articulaciones en una posición corporal constante.

Experimentalmente, la contracción muscular puede provocarse por la estimulación eléctrica del nervio que lo inerva o directamente al músculo. La respuesta mecánica que se genera se denomina *sacudida simple*. Una *sacudida simple isométrica* muestra una fase inicial (incremento de tensión) que se desarrolla con rapidez, le sigue una fase breve de relajación (reducción de tensión), para finalmente volver a su estado inicial de tensión (Figura 3).

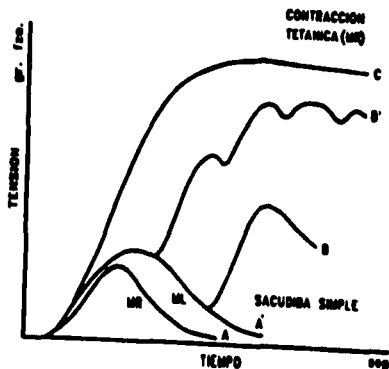


Figura 3.- Contracciones isotónicas del músculo esquelético del mamífero. A y A': sacudida simple de un músculo de sacudida rápida (MR) y de un músculo lento (ML), respectivamente. B y B': respuesta del músculo a la estimulación repetitiva. C: contracción tetánica.

Tomando en cuenta las características temporales de la contracción muscular, se ha propuesto que en los animales adultos existe una clara diferenciación entre los músculos de sacudida rápida y los músculos de sacudida lenta. La contracción correspondiente a músculos de sacudida rápida (Curva A; Figura 3) presenta un curso temporal más breve que el obtenido durante la contracción de los músculos lentos (Curva A'; Figura 3).

Ante estímulos repetitivos, la respuesta mecánica de los músculos se suma, esto es, si durante el período de relajación de una sacudida simple se vuelve a estimular al músculo, éste responde nuevamente con otro incremento de tensión, que se inicia a partir del valor de tensión que presentaba el músculo al relajarse, produciendo la suma de ambas respuestas (Curva B de la Figura 3). Al incrementar la frecuencia de los estímulos, el músculo desarrolla mucha mayor tensión que la producida por una sacudida simple y la separación de las contracciones se reduce, de tal manera que ante una frecuencia determinada las respuestas contráctiles se fusionan (curvas B' y C de la Figura 3). En ese momento, el músculo desarrolla la fuerza máxima que es capaz de ejercer y el registro que se obtiene es continuo. Esta respuesta se conoce como tétanos (1).

#### D. Ontogenia de las fibras musculares esqueléticas

Por lo general, el primordio de los músculos esqueléticos de la rata contiene fascículos de dos a seis fibras musculares inmaduras, denominados miotubos, cuyos sarcolemas se encuentran contactados entre sí mediante uniones comunicantes. Durante la histogénesis, los músculos presentan dos generaciones de miotubos: la primera se hace evidente a partir del día 15 de gestación. Poseen una miosina que responde fuertemente al anticuerpo específico para la miosina rápida. A partir del día 17 de gestación se inicia un cambio gradual en la miosina de los miotubos, la cual empieza a reaccionar con el anticuerpo específico para la miosina lenta. Al mismo tiempo, surge la segunda generación de miotubos que rodea a los de la primera generación. Estos miotubos presentan características inmunohisto-químicas de fibras musculares de contracción rápida y por lo general, mantienen una estrecha relación con los miotubos primarios (35).

Los miotubos de la primera y segunda generación presentan un núcleo central, una gran acumulación de glucógeno y miofibrillas periféricas. Estos complejos celulares están rodeados por una lámina basal, en la que se han observado dos formas de contacto neuromuscular, la primera consiste de una aposición estrecha entre el axón y la membrana plasmática del miotubo y la segunda, semejante a la de una placa motora primitiva, conformada por pequeños axones terminales que contienen vesículas opacas en su interior. Este

tipo de unión neuromuscular se observa exclusivamente en los miotubos primarios (35).

En los días previos al nacimiento (19 a 21 días embrionarios de la rata), los miotubos de la primera generación presentan placas terminales bien diferenciadas, mientras que los miotubos de la segunda generación, ya separados de los miotubos primarios, presentan placas terminales primitivas. En esta etapa del desarrollo, un porcentaje alto de fibras musculares reaccionan con el anticuerpo específico para la miosina lenta y supuestamente, son las que se originan de la primera generación de miotubos. En cambio, las fibras que surgen de la segunda generación de miotubos continúan reaccionando con el anticuerpo específico para la miosina rápida. Cabe señalar que en esta etapa del desarrollo muscular se presentan miotubos que reaccionan a ambos tipos de anticuerpos, considerándose que en éstas existe un tipo de miosina de transición.

En días posteriores al nacimiento, la mayor parte de las fibras musculares reaccionan tanto con el anticuerpo específico para la miosina rápida como con el de la miosina lenta. Solo algunas reaccionan exclusivamente con el anticuerpo para la miosina rápida o para el de la lenta, por separado. En las primeras tres o cuatro semanas de vida post-natal ocurre la diferenciación de las fibras musculares, en las que se manifiesta gradualmente un solo tipo de miosina, rápida o lenta. Tal diferenciación depende de la localización corporal y de la función del músculo (35).

Desde el punto de vista mecánico, también existen cambios en la actividad contráctil del músculo esquelético durante el desarrollo ontogénico. Close (8) reporta que durante el período post-natal temprano de los animales, todos los músculos de las extremidades desarrollan contracciones que presentan un curso temporal similar y que en las primeras cuatro semanas de vida ocurre la diferenciación de los músculos de contracción rápida o lenta (Figura 4A).

A medida que los músculos crecen, éstos son capaces de desarrollar mayor tensión durante la sacudida simple (Figura 4A) y generar tétanos con mayores frecuencias de estimulación (Figura 4B).

Como puede apreciarse, existe una clara correlación entre las observaciones efectuadas a nivel de la actividad contráctil con las realizadas utilizando técnicas inmunohistoquímicas, en el sentido de que los músculos de las extremidades posteriores de animales recién nacidos presentan una mayor proporción de fibras de contracción lenta y que tal proporción disminuye durante el desarrollo ontogénico (35). Ahora bien, la serie de cambios que ocurren durante el desarrollo, tanto en las propiedades contráctiles como en las

características inmuno-histoquímicas de los músculos esqueléticos, puede verse afectada por un gran número de factores, entre los que destacan: a) La influencia trófica que ejercen los axones nerviosos sobre la actividad contráctil del músculo; b) el incremento en la actividad de las enzimas oxidativas; c) el incremento en la actividad de la ATP-asa del retículo sarcoplásmico; d) la poli-inervación nerviosa de las fibras musculares de animales recién nacidos (véase más adelante); e) por la actividad muscular ("ejercicio"); y f) por acciones hormonales.

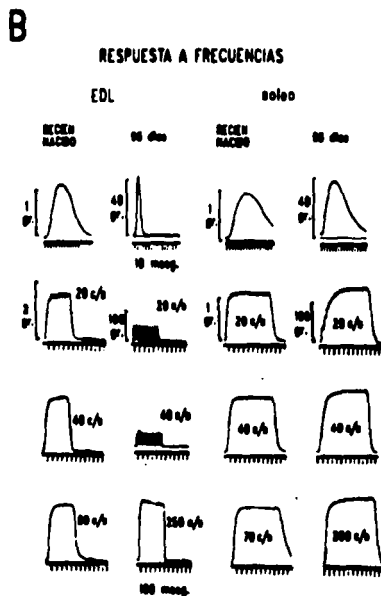
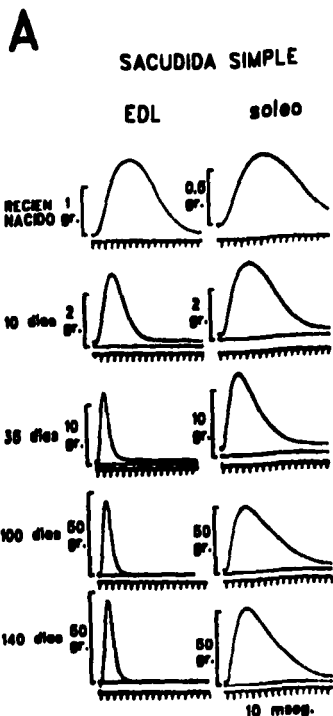


Figura 4.- A: Registros de la sacudida simple de los músculos extensor digitorum longus (EDL; músculo extensor de los dedos) y soleo (músculo extensor de la rodilla) durante el desarrollo postnatal de la rata. B: Respuesta a la estimulación con frecuencias de los músculos EDL y soleo de animales recién nacidos y de 95 días de edad postnatal (Modificado de B).

## DESARROLLO ONTOGÉNICO DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS NERVIOS PERIFÉRICOS

### A. Antecedentes generales

Los nervios periféricos están constituidos por conjuntos o haces de axones nerviosos que surgen de receptores sensoriales localizados en los músculos, la piel, las vísceras o provienen de neuronas motoras en la médula espinal. Su función principal es la de conducir la información (codificada como potenciales de acción) que se genera en los receptores sensoriales hacia la

TESIS CON  
FALDA DE ORIGEN

médula espinal o bien, transmitir el comando motor generado en neuronas espinales hacia los músculos.

Las características morfológicas y fisiológicas de los axones nerviosos periféricos son muy variadas, por lo que se les ha clasificado de acuerdo a diversos parámetros, tales como: la estructura periférica que inervan, sus características histológicas y/o sus propiedades funcionales.

De acuerdo a la estructura periférica que inervan los nervios periféricos se han clasificado de la siguiente manera:

a) Nervios cutáneos o sensoriales, presentan axones o fibras aferentes que surgen de receptores situados en la piel o en las vísceras.

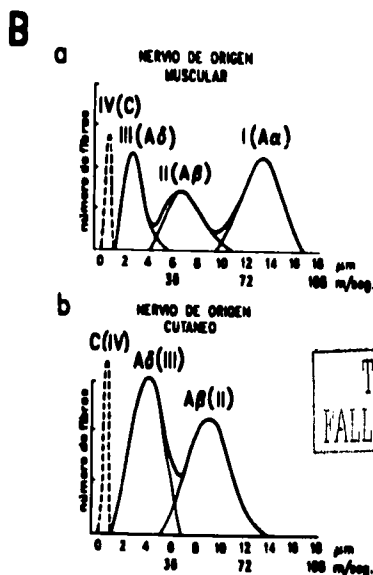
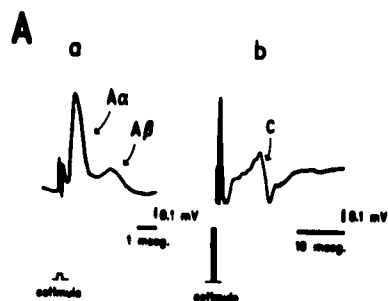
b) Nervios musculares o motores, están compuestos por axones aferentes provenientes de receptores sensoriales localizados en los músculos, tales como los husos musculares y los órganos tendinosos de Golgi, y por axones o fibras eferentes que se originan en las motoneuronas espinales.

Por la presencia o ausencia de vainas de mielina a su alrededor, los axones nerviosos cutáneos y/o motores, también han sido clasificados como mielínicos o amielínicos. Además, los axones mielínicos y amielínicos que conforman a los nervios cutáneos y motores presentan diámetros diferentes, lo que también ha sido utilizado como criterio para su clasificación (Véase la Tabla I y la figura 5B<sub>a,b</sub>).

Erlanger y Gasser (14) proponen una nomenclatura alfabética para denominar a los axones de nervios periféricos de origen cutáneo o muscular. En cambio, Lloyd y Chang (28) sugieren una nomenclatura numérica para identificar solamente a las fibras nerviosas motoras (tabla I).

TABLA 1.- Clasificación de los axones que componen los nervios periféricos.

CLASIFIC. ALFABÉTICA	CLASIFIC. NUMÉRICA	DIÁMETRO	VELOC. DE CONDUC.	ESTRUCT. INERVADA
A $\alpha$	I	13-20 $\mu$ m	72-120 m/s	músculos
A $\beta$	II	6-12 $\mu$ m	24-71 m/s	piel, vísceras, músculos
A $\delta$	III	1-5 $\mu$ m	6-23 m/s	piel,
C	IV	< 1 $\mu$ m	0.5-5m/s	piel, músculos



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 5.- A: Registro de los componentes A y C del Potencial de Acción Compuesto de un nervio periférico muscular de la rata. Registros provocados por estímulos de baja (a) y alta (b) intensidad. B: Gráficas del número de axones nerviosos con respecto a la velocidad de conducción y al diámetro de los axones periféricos de origen muscular (a) y de origen cutáneo (b). (Adaptado de 30).

Las principales características morfológicas de las fibras nerviosas que conforman a los nervios periféricos, son las siguientes:

**Fibras del grupo A $\alpha$** , son fibras mielínicas gruesas, cuyo diámetro varía de 13 a 20  $\mu\text{m}$ . Proviene de receptores de husos musculares y de órganos tendinosos de Golgi, así como de las motoneuronas alfa localizadas en la médula espinal (fibras eferentes). Según la clasificación numérica de Lloyd y Chang (28), los axones que surgen de receptores musculares se les conoce como fibras aferentes del Grupo I (las fibras provenientes de husos musculares primarios, reciben la denominación de fibras del Grupo Ia, mientras que los axones de órganos tendinosos de Golgi se denominan como fibras del grupo Ib).

**Fibras del grupo A $\beta$** , son fibras mielínicas cuyo diámetro varía de 6 a 12  $\mu\text{m}$ , provienen de receptores de presión ligera y del pelo de la piel, de las vísceras, así como de husos musculares secundarios. Estas últimas, también se les denomina como fibras aferentes del Grupo II.

**Fibras del grupo A $\delta$** , tienen un diámetro de 1 a 5  $\mu\text{m}$  y provienen de receptores de temperatura, tacto grueso, presión profunda o de receptores al dolor. En nervios motores, estos axones son denominados como fibras del Grupo III y provienen de receptores de presión profunda.

**Fibras del grupo C**, son fibras muy delgadas cuyo diámetro es inferior a 1  $\mu\text{m}$  y no presentan vainas de mielina. Transmitem información de índole dolorosa, de temperatura extrema y de tacto grueso. En los nervios motores son conocidas como fibras del grupo IV y transmiten información nociceptiva de terminales libres localizadas en los músculos.

Estrechamente relacionadas con sus características morfológicas, las fibras nerviosas presentan propiedades funcionales que permiten diferenciarlas entre sí. Por ejemplo, el umbral eléctrico para generar el potencial de acción en las fibras nerviosas varía en proporción inversa con el diámetro de los axones, esto es, los axones del grupo A $\alpha$  poseen un umbral eléctrico de activación menor que el de las A $\beta$ , y el de estas últimas es inferior al de las A $\delta$ . En el caso de las fibras amielínicas del grupo C, su umbral de activación es considerablemente mayor, entre 10 y 100 veces, que el de las fibras A $\alpha$ . Esta característica funcional es utilizada experimentalmente para activar, de manera selectiva a los distintos grupos de axones, empleando para ello pulsos graduados de corriente eléctrica aplicados a los nervios periféricos.

Otra de las propiedades funcionales de las fibras nerviosas es la velocidad con la que conducen los potenciales de acción. Esta propiedad depende de la presencia y de las características de la vaina de mielina que

envuelve a los axones nerviosos, entre las que se cuentan el grosor de la vaina, la distancia entre nodos de Ranvier y el grado de compactación de las vainas de mielina. (42, 44). Dado que las fibras de los grupos A $\alpha$ , A $\beta$  y A $\delta$  presentan vainas de mielina, su velocidad de conducción es considerablemente mayor que la de las fibras amielínicas o del grupo C (tabla I).

## B. Características de la respuesta eléctrica de los nervios periféricos

Al estimular un nervio periférico con pulsos de corriente eléctrica de intensidad supraumbrales, es posible registrar en él una respuesta eléctrica que se denomina Potencial de Acción Compuesto (PAC). Este potencial resulta de la suma de los potenciales de acción que se generan en cada uno de los axones del nervio. Debido a la presencia de fibras nerviosas con diferente umbral de activación y con distinta velocidad de conducción, el registro del PAC de un nervio periférico muscular puede presentar diversos componentes: el primero de ellos es de latencia de aparición breve (Figura 5Aa) y es producido por la activación de fibras mielínicas de bajo umbral (tipo A $\alpha$ ). A medida que se incrementa la intensidad del estímulo, se presenta un segundo componente que es producido por fibras mielínicas de mayor umbral (tipo A $\beta$ ) y en algunas ocasiones hasta del tipo A $\delta$ . El tercer componente (Figura 5Ab) es generado por la excitación de fibras del tipo C y sólo se registra cuando el nervio es estimulado con pulsos de corriente de gran intensidad (10 a 50 veces la requerida para activar las fibras del primer componente).

## C. Desarrollo ontogénico de los nervios periféricos

Las neuronas son células altamente polarizadas tanto estructural como funcionalmente. La polaridad de las neuronas se manifiesta por diferencias estructurales entre el axón y las dendritas. Por ejemplo, ciertos organelos celulares como los ribosomas y los elementos de Golgi, están presentes en las dendritas pero no en los axones (23). El citoesqueleto también presenta polaridad en su organización estructural ya que se ha observado que el extremo grueso de los microtubulos se encuentra orientado hacia la región de crecimiento axonal, mientras que el extremo más angosto se ubica en el centro del cuerpo celular. Otra manifestación de la polaridad neuronal es la distribución de las especializaciones pre- y post-sinápticas que determinan la dirección del tráfico de impulsos nerviosos (22).

Durante la diferenciación y crecimiento neuronal, la región correspondiente al axón sufre un incremento en su longitud, prolongándose desde el soma hacia las células blanco, en donde establece contactos sinápticos (24). El crecimiento de los axones hacia sus blancos se inicia por la tendencia intrínseca de alargamiento del cono axónico, la cual puede ser modulada por

numerosos factores del medio ambiente que promueven o inhiben el crecimiento del axón.

El cono de crecimiento puede ser estimulado por distintas moléculas promotoras (por ejemplo: el Factor de Crecimiento Neuronal) que se encuentran en mayor concentración cerca del órgano blanco. Aparentemente el cono de crecimiento posee receptores membranales específicos para tales moléculas, los cuales al parecer tienen también la capacidad de modificar la dirección del axón en desarrollo. Además, las células localizadas en la vía de crecimiento del axón e incluso las células blanco, producen factores de crecimiento que interactúan con el cono de crecimiento axónico, acelerando o inhibiendo el desarrollo del mismo (23).

Por otra parte, la actividad de ciertos grupos celulares, como las células de Schwann (que rodean a los axones periféricos), depende de la interacción con el axón en crecimiento. Se ha reportado que la mitosis de las células de Schwann solo se efectúa durante el proceso de crecimiento del axón y posiblemente esta sea consecuencia de la presencia de factores de crecimiento axonal (45).

Además de su crecimiento en longitud, los axones que constituyen los nervios periféricos en desarrollo incrementan gradualmente su diámetro y en el caso de las fibras mielinizadas, las vainas de mielina se depositan y compactan.

En el Sistema Nervioso Periférico la vaina de mielina es formada por células de Schwann, las cuales desde el punto de vista embrionario se originan en la cresta neural (11), de donde migran hacia los nervios periféricos (4). Estando en contacto con el axón del nervio periférico, las células de Schwann proliferan en su número, probablemente debido a su interacción con sustancias producidas por los mismos axones durante su desarrollo (32, véase el párrafo anterior).

En las fases iniciales del proceso de mielinización, la célula de Schwann rodea al axón, dejando un canal (mesaxón) abierto hacia el espacio extracelular. En ese momento, surge una prolongación de la célula de Schwann semejante a una lengüeta, que rodea al axón formando una espiral. Posteriormente, el citoplasma de las células de Schwann es desplazado de la porción internodal, quedando confinado en dos collares, uno interno cerca del extremo externo en la cercanía del nodo de Ranvier (23). Justo antes de que se formen las lamelas de mielina, las células de Schwann incrementan considerablemente la síntesis de lípidos (3) y finalmente, las vainas de mielina se compactan formando las lamelas

Desde el punto de vista funcional, la presencia de vainas de mielina y el grado de compactación de las mismas, permite a los axones incrementar notablemente la velocidad de conducción del impulso nervioso (20).

Existen en la literatura muy pocos reportes experimentales que describan las respuestas eléctricas de nervios periféricos en desarrollo. Fitzgerald (15) reportó que el Potencial de Acción Compuesto del nervio sural (predominantemente cutáneo) de ratas recién nacidas, presenta los mismos componentes que se observan en nervios de animales adultos, pero poseen mayor umbral de activación y menor velocidad de conducción. Conforme los animales van creciendo, disminuye el umbral de activación y aumenta la velocidad de conducción del componente A $\beta$ . En cambio, las características funcionales del componente C permanecen constantes. Estas observaciones podrían explicarse si se considera que las fibras del tipo A $\beta$  de los nervios de animales recién nacidos, presentan un diámetro muy pequeño y no poseen mielina y que al paso del tiempo, éstas aumentan de grosor y se les forma la vaina de mielina a su alrededor. Fitzgerald (15) también observa que entre los días 6 y 10 post-natales, la forma del PAC del nervio cutáneo sural se vuelve más compleja, ya que en ella es posible observar tres componentes que presumiblemente resultan de la activación de fibras gruesas A $\beta$ , parcialmente mielinizadas; de fibras A $\delta$ , también parcialmente mielinizadas y de fibras C, no mielinizadas, respectivamente. En experimentos realizados en nuestro laboratorio (39) hemos observado que el área del componente A $\beta$  del PAC registrado en el nervio sural de ratas en desarrollo se incrementa gradualmente en función de la edad de los animales, lo cual puede explicarse si se considera que a medida que los axones en desarrollo incrementan de diámetro, se reduce su umbral de activación. Esto es, puesto que los axones nerviosos en los animales recién nacidos son muy finos, su umbral de activación es muy alto y sólo algunos de ellos pueden ser excitados, registrándose un PAC de pequeña amplitud (Figura 6A). A medida que los animales crecen, el grosor de las fibras nerviosas se incrementa lo que trae como consecuencia una reducción en su umbral de activación y es posible, por lo tanto excitar un mayor número de fibras aferentes y registrar un PAC de mayor amplitud (Figura 6A y B).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



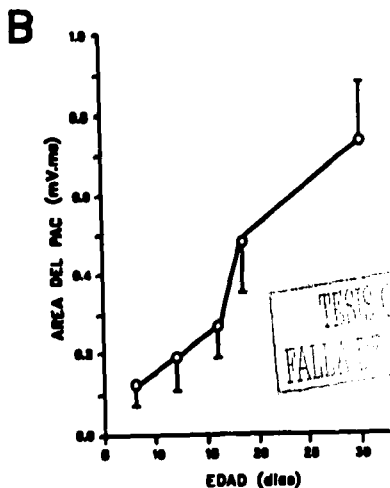
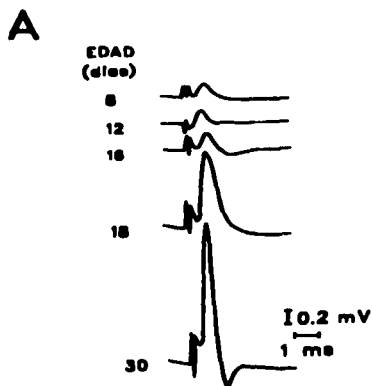


Figura 6.- El número de axones mielinizados del grupo A, que responden a la estimulación con pulsos de corriente, se incrementa durante el desarrollo postnatal de la rata.

#### D. Formación de la placa neuromuscular

Los axones eferentes de los nervios periféricos musculares interactúan con las fibras musculares en sitios discretos del sarcolema llamados placas o uniones neuromusculares. La formación de la placa neuromuscular es un proceso ontogénico muy complejo, que requiere de una íntima relación anatómica y funcional entre las terminales nerviosas y las fibras musculares en desarrollo. En la rata, se ha reportado que la formación de las uniones nervio-músculo se inicia en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Pocas horas después de que los axones en crecimiento alcanzan los primordios de fibras musculares, durante el período de fusión de los mioblastos, se establecen los primeros contactos sinápticos sobre los miotubos recién formados (10).

La primera condición para que se forme la placa neuromuscular es la de que el axón terminal reconozca a la futura fibra muscular como una célula blanco apropiada. Se ha propuesto que en este proceso de reconocimiento celular tienen un papel preponderante, la liberación espontánea de acetilcolina de las terminales axonales (46) y la presencia de numerosos receptores a la acetilcolina (RACH) en toda la superficie de los miotubos (12). Sin embargo, también se ha propuesto la existencia de moléculas proteínicas relacionadas con el proceso de identificación del elemento postsináptico, una de ellas es la glucoproteína llamada N-CAM ("neural cell adhesion molecule"), localizada tanto en la membrana de los mioblastos y de los miotubos recién formados como en el soma y en las terminales axonales de las motoneuronas (9) y que, como su nombre lo indica, facilita la unión entre el cono de crecimiento de los axones motores y los miotubos (36). También se ha sugerido la existencia de otras moléculas que estarían involucradas en la identificación de las células blanco, llegandose incluso a proponer que algunas de ellas participan en la innervación específica de ciertos tipos de músculos, pero hasta el momento no se cuenta con evidencia experimental que apoye tal suposición.

La formación del primer contacto axonal con el miotubo provoca que en éste, se facilite la formación de otras uniones neuromusculares, de manera que en días posteriores se presentan placas sinápticas a lo largo de toda la fibra muscular, llegando a presentarse lo que se denomina como poli-innervación. El grado de poli-innervación y el tiempo en que ésta alcanza su máxima expresión varía de músculo a músculo; por ejemplo, se ha reportado que la máxima poli-innervación de los músculos intercostales ocurre uno o dos días previos al nacimiento, cuando cada fibra muscular es innervada por un promedio de 3.5 axones motores (10), mientras que en las ratas recién nacidas las fibras musculares del soleo (extensor del tobillo) son innervadas por 6 axones en promedio (7) y las del extensor digitorum longus (ED); extensor de los dedos) por 3 terminales nerviosas (2).

La poli-inervación presente en los animales recién nacidos es eliminada durante las primeras semanas de vida postnatal, para dar paso al patrón de inervación típico de los animales adultos. Se ha reportado que en la mayoría de los músculos estudiados, el porcentaje de fibras poli-inervadas se mantiene constante en los primeros días de vida postnatal, disminuyendo súbitamente entre los 6 y 16 días de edad, aproximadamente (2, 7, 16).

Los mecanismos involucrados en la eliminación de las terminaciones nerviosas redundantes aún no son bien conocidos, pero se han propuesto dos hipótesis para explicar la pérdida de la poli-inervación: la primera supone una retracción de las fibras nerviosas redundantes (27) y la segunda sugiere una degeneración selectiva de las terminales redundantes (33). La hipótesis de la retracción de las fibras nerviosas redundantes es apoyada por la presencia de bulbos de retracción en neuronas en cultivo y en células obtenidas de animales en desarrollo (31), por lo cual esta hipótesis es la más aceptada en la actualidad.

La retracción de las terminales nerviosas durante la eliminación de sinapsis supernumerarias puede ser regulada por la interacción de los axones con las fibras musculares. Por ejemplo, se ha sugerido que en las fibras musculares se presentan compuestos que incrementan la supervivencia de las neuronas en cultivo (41), por lo que se ha propuesto que las fibras musculares producen un factor de crecimiento (denominado "muscular nerve-growth factor", MNGF) que permite la supervivencia del axón (25). Aunque también se ha sugerido que cuando una fibra muscular es estimulada sinápticamente, ésta produce enzimas proteolíticas que provocan la retracción de los axones nerviosos (31).

La inactividad muscular entorpece la eliminación de las sinapsis supernumerarias, por lo cual se supone que los factores de crecimiento de las motoneuronas y las enzimas proteolíticas relacionadas con la eliminación de las sinapsis redundantes son sintetizadas en respuesta a la actividad muscular (25).

#### E. Comentario final

Para que se lleve a cabo la manifestación de una conducta motora en particular, es imprescindible que los circuitos neuronales, centrales y espinales, así como las estructuras sensitivas y motoras periféricas estén completamente desarrolladas en los animales y además, que entre ambos sistemas exista una notable relación funcional. Un ejemplo de lo anterior es la manifestación de la conducta locomotora en la rata neonata, la cual se hace presente en edades post-natales tempranas (entre la 2a y 3a semanas post-natales) (37, 43) a pesar

de que los circuitos espinales y centrales ("Generadores Centrales de Patrones Rítmicos"), responsables de la generación de pautas locomotoras (véase 26) ya están formados completamente a partir de etapas embrionarias (16-17 días de gestación (6)). Por lo tanto, las pautas locomotoras se hacen evidentes hasta que los nervios y los músculos periféricos, así como la interacción fisiológica entre ellos, se encuentren totalmente desarrollados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado parcialmente por el donativo 26342N del CONACYT y por el Sistema Nacional de Investigadores.

## REFERENCIAS

Hodgkin DJ. *The Physiology of Excitable Cells*. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 1989. pp. 16-20.

Malenka-Griffin RJ, Thompson WJ. Synaptic rearrangements and alterations in motor unit properties in neonatal rat extensor digitorum longus muscle. *J. Neurobiol.* 1988; 19:1-210.

Benjamin JA, Smith ME. Metabolism of myelin. En: *Myelin*. Morell, P. (Ed.). Plenum. New York. 1984. pp. 225-258.

Hillings-Gagliardi S. Mode of locomotion of Schwann cells migrating in vivo. *Am. J. Anat.* 1977; 150:73-88.

Moore W, Fawcett DW. *A textbook of histology*. 10 ed. Philadelphia, Saunders. 1975.

159  
Pinar F, Clara F, Vinyal L.: What is the contribution on the development of spinal descending pathways to the ontogeny of motor activities in the neonatal rat. 27th. Annual Meeting, Society for Neuroscience Abstr. 410.16. 1997.

Johnson M, Jansen J, Van Essen D. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. *J. Physiol.* 1976; 261:387-397.

Joseph RI. Properties of Fast and Slow Skeletal Muscles of the Rat During Development. *J. Physiol.* 1964; 173:74-95.

160  
Jovault J, Sanes JR. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic membranes of developing and adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 1986; 102:716-730.

Dennis MJ, Ziskind-Conhaim L, Harris AJ. Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Develop. Biol.* 1981; 81:266-279.

Detwiler SR, Kehoe K. Further observations on the origin of the sheath of Schwann. *J. Exp. Zool.* 1939; 81:415-435.

Diamond J, Mileti R. A study of fetal and new-born rat muscle fibres. *J. Neurobiol.* 1962; 3:393-408.

13. Eckert R, Randall D. *Animal physiology: mechanism and adaptation*. W.H Freeman & Co. New York. 1978. pp. 343-390.

14. Erlanger J, Gasser HS. *Electrical signs of nervous activity*. Univ. Pennsylvania Press, Philadelphia. 1937.

15. Fitzgerald M. The postnatal development of cutaneous afferent fibre input and receptive field in the rat dorsal horn. *J. Physiol.* 1985; 364:1-18.

16. Fladby T. Postnatal loss of synaptic terminals in the normal mouse soleus muscle. *Acta Physiol. Scand.* 1987; 129:229-238.

17. Goldspink G. The ATP usage by fast and slow muscle in the maintenance of isometric tension. *J. Physiol.* 1980a; 306:28-29.

18. Goldspink G. *Growth of Muscle*. En: *Development and Specialization of Skeletal Muscle*. Goldspink, D. (Ed.) Cambridge University Press. Cambridge. 1980b. pp. 65-89.

19. Gordon J, Ghez C. *Muscle receptors and spinal reflexes: The stretch reflex*. En: *Principles of Neural Science*. Kandel, E., Schwartz, J.H. y Jessel, T.M. (Eds.) Appleton and Lange, Connecticut. 3a. ed. 1991. Cap. 37, pp. 563-580.

20. Gutierrez R, Boison D, Heineman O, Stoffel W. Decompaction of central nervous system myelin leads to a reduction of the conduction velocity of action potential in optic nerve. *Neurosci. Lett.* 1993; 195:93-96.

21. Ham A. *Tratado de Histología*. Interamericana, México. 1967. pp. 438-466.

22. Heidemann SR, Landers JM, Hamborg MA. Polarity orientation of axon microtubules. *J. Cell Biol.* 1981; 9:661-665.

23. Jacobson M. *Developmental Neurobiology*. Plenum Press. New York and London. 1993. pp. 163-215.

24. Jacobson M, Huang S. Neurite outgrowth traced by means of horseradish peroxidase inherited from neuronal ancestral cells in frog embryos. *Dev. Biol.* 1985; 110:102-113.

25. Jansen J, Fladby T. The perinatal reorganization of the innervation of skeletal muscle in mammals. *Prog. Neurobiol.* 1990; 34:39-90.



26. Jiménez I. La locomoción en los vertebrados. ¿Y usted cómo camina?. Elementos. 1998. En prensa
27. Korneliusen H, Jansen JKS. Morphological aspects of the elimination of polynuclear innervation of skeletal muscle fibres in newborn rats. *J. Neurocytol.* 5: 591-604. 1976.
28. Lloyd DPC, Chang HT. Afferent fibers in muscle nerves. *J. Neurophysiol.* 11: 199-208. 1948.
29. Lutz H, Weber H, Billeter R, Jenny E. Fast and slow myosin coexist within single skeletal muscle fibers of adult rabbits. *Nature.* 281: 142-144. 1979.
30. Martin JH, Jessell TM. Modality coding in the somatic sensory system. En: *Principles of Neural Science*. Kandel, E., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (Eds.) Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut. 3a. ed. 1991. Cap. 24, pp. 341-352.
31. O'Brien RA, Osterberg AJ, Vrbova G. Observation on the elimination of polynuclear innervation in developing mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 282: 571-582. 1978.
32. Ratner N, Glaeser L, Smith ME. PC12 cells as a source of neurite-derived cell surface mitogen which stimulates Schwann cells division. *J. Cell. Physiol.* 98: 1150-1155. 1984.
33. Rosenthal, J.L. y Taraskevich, P.S. Reduction of multi-axonal innervation at the neuromuscular junction of the rat during development. *J. Physiol.* 270: 299-310. 1977.
34. Rosenblueth A, Alanis J, Rubio R. A Comparative Study of the Isometric and Isotonic Contractions of Striated Muscles. *Arch. Int. Phys. Bioch.* 66: 330-353. 1958.
35. Rubinstein N, Kelly A. Development of Muscle Fiber Specialization in the Rat Hindlimb. *J. Cell. Biol.* 90: 128-144. 1981.
36. Rutishauser U, Grumet M, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule mediates initial interactions between spinal cord neurons and muscle cells in culture. *J. Cell. Biol.* 97: 145-152. 1983.

37. Salas M. Effects of early malnutrition on the development of swimming ability in the rat. *Physiol. Behav.* 8: 119-122. 1972.
38. Salmons A, Vrbova G. The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J. Physiol.* 201: 535-549. 1969.
39. Segura B, Gutierrez AL, Guadarrama JC, Jiménez I. Effects produced by nutritional deficiencies on the compound action potential of sural nerves in the developing rat. En preparación.
40. Sheard P, McCaig CD, Harris AJ. Critical periods in rat motoneuron development. *Develop. Biol.* 102: 21-31. 1984.
41. Smith RG, Vaca K, McManaman J, Appel SH. Selective effects of skeletal muscle extract fractions on motoneuron development *in vitro*. *J. Neurosci.* 6: 439-447. 1986.
42. Waxman SG. Conduction in myelinated, unmyelinated and demyelinated fibers. *Arch. Neurol.* 34: 585-589. 1977.
43. Westerga J, Gramsbergen A. The development of locomotion in the rat. *Develop. Brain Res.* 57: 163-174. 1990.
44. Wilson P, Kitchener PD. Plasticity of cutaneous primary afferent projections to the spinal dorsal horn. *Prog. Neurobiol.* 48: 105-129. 1996.
45. Wood PM, Bunge RP. Evidence that sensory axons are mitogenic for Schwann cells. *Nature* 256: 662-664. 1975.
46. Xie ZP, Poo MM. Initial events in the formation of neuromuscular synapse: Rapid induction of acetylcholine release from embryonic neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

# DESARROLLO POST-NATAL DE LAS PROPIEDADES FISIOLÓGICAS DE MUSCULOS Y NERVIOS PERIFÉRICOS DE LA RATA. EFECTO DE DEFICIENCIAS ALIMENTARIAS.

Jiménez-Estrada, I.\*, Segura, B.\*\*, Guadarrama, J.C.\*, Pratz, G.\*\*, Gutierrez, A.L.\*\* y Betanzos, A\*\*. Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN, y Dpto. Biología, ENEP Izcalca, UNAM.

Responsable del Proyecto: Dr. Ismael Jiménez Estrada. Ref. 26342-N

Dirección: Dpto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508 Col. Sn. Pedro Zacatenco, Deleg. Gustavo A. Madero, México, D.F. Tel. 57477000 ext. 5704-5163, correo electrónico: [ijimenez@fisio.cinvestav.mx](mailto:ijimenez@fisio.cinvestav.mx)

Palabras clave: Desnutrición, malnutrición, contracción, potencial de acción.

## RESUMEN

El presente proyecto tuvo como finalidad el determinar las posibles alteraciones que genera una alimentación deficiente, en cantidad y/o calidad, sobre la mecánica contráctil de los músculos esqueléticos y sobre la generación y propagación del potencial de acción compuesto (PAC) de nervios periféricos durante el desarrollo postnatal de la rata. Nuestros resultados sugieren que la desnutrición y la malnutrición perinatal enlentecen la transformación de fibras musculares lentas a rápidas durante el desarrollo postnatal de los músculos rápidos, esto es, presentan características contráctiles de músculos lentos durante períodos de tiempo postnatales prolongados. Por otra parte, la desnutrición y la malnutrición alteran considerablemente las propiedades de generación y conducción del impulso nervioso en los axones de nervios periféricos y que tal efecto podría deberse a diversas razones, entre las que destaca la inadecuada mielinización de los axones aferentes durante el desarrollo postnatal temprano de las crías; lo que probablemente generaría alteraciones drásticas y permanentes en la conformación de los nodos de Ranvier o en la distribución y/o incorporación de canales de sodio en la membrana axonal, que a su vez conduciría a un bloqueo en la propagación del potencial de acción transmitido a través de los axones nerviosos

periféricos. Cabe añadir que a partir de nuestras observaciones es factible establecer que una reducción drástica en el contenido proteínico del alimento proporcionado a las crías en desarrollo es la causa principal de las alteraciones que se observan en la mecánica contráctil de los músculos esqueléticos y en la generación y propagación del PAC en nervios periféricos.

## INTRODUCCIÓN

Para conservar la integridad anatómica y funcional de los organismos es indispensable que éstos reciban un aporte adecuado y suficiente de nutrientes. En el caso de que un organismo reciba un aporte inadecuado de alimentos, en cantidad y/o en calidad, durante su desarrollo embrionario y/o de lactancia, presentará importantes alteraciones anatómicas, funcionales y conductuales durante toda su vida (Waterlow y Stephen, 1969; Goldspink y Ward, 1979; Howart, 1972; Lopes et al., 1982; Russell et al., 1984a,b; Morgane et al. 1978, 1993).

Se ha puesto mucho interés en el análisis de las posibles alteraciones que desencadena una ingesta de alimento reducida en diversos tejidos y órganos de los animales, en los que destacan el sistema nervioso y el sistema muscular. A pesar de que en la actualidad se cuenta con un considerable cúmulo de evidencias, desde los puntos de vista morfológico, electrofisiológico, bioquímico y conductual, de los efectos que produce la desnutrición en el Sistema Nervioso Central (ver Morgane et al., 1978, 1993), poco se conoce de las alteraciones que genera una deficiencia alimenticia, en cantidad y/o calidad, sobre las características funcionales de músculos esqueléticos y de nervios periféricos de animales en desarrollo.

## OBJETIVOS

En este estudio se plantea la realización de dos tipos de protocolos experimentales, los cuales por sí mismos conllevan objetivos generales distintos.

Objetivo A: Determinar los efectos que produce una alimentación perinatal inadecuada, en cantidad o calidad, sobre las propiedades contráctiles de músculos esqueléticos de ratas en desarrollo.

Objetivo B: Caracterizar las alteraciones que produce una alimentación perinatal inadecuada, en cantidad y/o calidad, sobre la generación y conducción del impulso nervioso en nervios periféricos de ratas en desarrollo.

## MATERIAL Y METODOS:

Métodos de desnutrición y malnutrición: Se utilizaron crías de ratas de la variedad Wistar, sometidas a deficiencias alimentarias durante el período perinatal. Para ello un lote de ratas hembras en edad reproductiva

154



fue dividido al azar en tres grupos: a) Grupo de animales control. Este grupo de ratas hembras gestantes tuvo libre acceso al agua y al alimento (Formulab 5008, LabDiet) durante toda la fase experimental; b) Grupo de animales desnutridos. Este grupo de ratas fue alimentado con el 50% de la cantidad de alimento que, en promedio, ingerían las ratas control, desde dos semanas antes del apareamiento con el macho y durante los periodos de gestación y lactancia (Chow y Lee, 1964; Bedi, 1994); las crías a su vez fueron alimentadas con el mismo regimen alimenticio después del destete (día 21 post-natal); y c) Grupo de animales malnutridos. Este grupo de animales fue sometido antes del apareamiento y durante la gestación y la lactancia a una dieta baja en proteínas (pellets de comida con bajo contenido de caseína, 6%; Morgane et al., 1978) así como a sus crías, después del destete. A todos los animales se les proporcionó agua ad libitum. En el día del parto (día cero post-natal), se ajustó a ocho el número de crías por camada y desde ese entonces, todos los días se determinó el peso corporal de cada una de las crías hasta el día en que se realizó el experimento agudo (registro de la actividad contráctil del músculo esquelético o del potencial de acción compuesto en el nervio sural; vease más adelante).

#### Protocolo experimental I: Mecánica contráctil:

El registro de la actividad contráctil de los músculos tibial (rápido) y gastrocnemio (mixto) de ratas control, desnutridas y malnutridas, se efectuó in vivo los días 15, 25 y 35 post-natales, los cuales comprenden el período de tiempo en el que se completa el proceso de diferenciación de las fibras musculares (lentas>rápidas>lentas y lentas>rápidas no fatigables>rápidas fatigables; Close, 1964). Los animales fueron anestesiados mediante la aplicación intraperitoneal de uretano (1.6 g/kg de peso; Komisaruk, Adler y Hutchinson, 1972). La exposición de los músculos tibial y gastrocnemio se realizó mediante incisiones longitudinales en la piel de las extremidades posteriores y los músculos fueron identificados y disecados siguiendo las indicaciones anatómicas de Popesko, et al. (1992), teniendo especial cuidado en mantener intacta la circulación sanguínea de la extremidad durante todo el experimento. Para evitar en lo posible, la generación de artefactos de índole mecánica durante el registro, tanto la pelvis como la parte distal de la tibia de las extremidades posteriores fueron fijadas firmemente con alfileres de acero inoxidable a la tabla de disección. Asimismo, los músculos se mantuvieron en un ambiente húmedo mediante la aplicación continua de solución salina (cloruro de sodio 0.9%) a una temperatura de  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante la disección y el experimento. Debido a la

disposición anatómica de los músculos, en primer lugar se registró la actividad contráctil del músculo tibial y posteriormente la del músculo gastrocnemio. En su oportunidad, el tendón localizado en la parte distal de cada uno de los músculos fue atado con un hilo resistente e indeformable a un miografo isométrico (Grass, FT 03B).

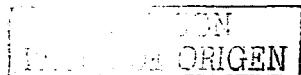
Para provocar la sacudida simple y la respuesta tetánica de los músculos tibial y gastrocnemio de las ratas control, desnutridas y malnutridas, se utilizó un par de electrodos de estimulación colocados sobre la superficie de los músculos, con los cuales se aplicaron pulsos eléctricos (de intensidad supramáxima y 0.2 ms de duración) o trenes de pulsos (de similar intensidad y duración pero con las siguientes frecuencias 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 100 Hz; durante tres segundos).

La actividad contráctil de los músculos tibial y gastrocnemio fue registrada en papel mediante un polígrafo Grass, modelo 79 D y se midió la tensión máxima desarrollada por ambos músculos al ser estimulados con pulsos únicos o con cada una de las frecuencias de estimulación señaladas. En adición, se midió el tiempo al pico y el tiempo de relajación de la sacudida simple, así como la frecuencia de estimulación en la que se fusionaba la respuesta mecánica ("frecuencia de fusión").

Es bien conocido que para lograr que las sarcómeras de las fibras musculares puedan desarrollar tensión es necesario que los elementos elásticos en paralelo que las rodean (tejido conectivo) y los elementos elásticos en serie que las unen al hueso (tendones), estén parcial o totalmente estirados (Hill, 1938, Huxley y Niedergerke, 1954). Por ello, en el presente estudio se determinó la longitud óptima en la que los músculos desarrollan su máxima tensión durante una sacudida simple antes de efectuar el registro de la actividad contráctil.

Con la finalidad de establecer la relación tensión-longitud para los músculos tibial y gastrocnemio de ratas normales, desnutridas y malnutridas, éstos fueron estirados a diferentes longitudes iniciales (80, 90, 100, 110, 120 y 130%), con respecto a la longitud fisiológica de reposo y fueron estimulados con pulsos únicos de intensidad supramáxima y 0.2 ms de duración. Se cuantificó la tensión de reposo o tensión pasiva y la tensión activa, producidas por cada uno de los músculos (n=10) en las longitudes iniciales antes señaladas.

Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para determinar las posibles diferencias entre grupos y tratamientos (Zar, 1974).



## Protocolo experimental 2: Potencial de Acción Compuesto (PAC).

En esta serie de experimentos se utilizó el nervio sural debido a que este nervio está conformado predominantemente por fibras aferentes de origen cutáneo (provenientes de mecano-receptores localizados en la piel de la parte anterior de la pata del animal), es de fácil acceso por disección y es relativamente largo, aún en animales muy jóvenes. Los registros se efectuaron en nervios ( $n=8-10$ ) de animales de 8, 12, 16, 25, 30, 60 y 90 días de edad post-natal, de los lotes control o experimentales. Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400 mg/Kg de peso) y se diseccionaron los nervios sural de ambas extremidades. Cada nervio fue colocado en una cámara de registro con solución Krebs (NaCl: 128, KCl: 3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.5, CaCl<sub>2</sub>: 1.5, MgSO<sub>4</sub>: 4.1, NaHCO<sub>3</sub>: 21, Glucosa: 30 mM) a temperatura ambiente (18-22°C). Uno de los extremos del nervio fue introducido en una micropipeta de succión para estimulación, la cual estuvo conectada a un generador Digitimer modelo 3290, con el que se aplicaron pulsos de corriente de amplitud y duración controlados. La magnitud de la corriente eléctrica aplicada fue determinada a partir de la caída de voltaje registrada a través de una resistencia eléctrica (1000  $\Omega$ ) colocada en la vía de regreso a tierra del estímulo. La respuesta del nervio estimulado, el Potencial de Acción Compuesto (PAC), se registró mediante otra micropipeta de succión (Stys, 1992), conectada a un amplificador de alta ganancia Grass modelo P711 y este a su vez a un osciloscopio Textronix, modelo D13 y a un sistema de videograbación Sony. Los registros obtenidos se almacenaron en cintas de video, para su posterior análisis (promediación y cálculo del área) mediante un programa de computadora, elaborado expresamente para ello en el laboratorio.

Las fibras aferentes mielínicas del grupo A de los nervios sural de los animales control, desnutridos y malnutridos, fueron estimuladas con pulsos únicos de 0.05 ms de duración y de intensidad suficiente para provocar el PAC de máxima amplitud (2-3xU). Puesto que se considera al área del potencial de acción compuesto como un índice del número de axones activados por el estímulo (Patton, 1965), se determinó la amplitud y el área del PAC registrados así como el umbral eléctrico de activación y la relación intensidad-duración del estímulo umbral. Asimismo, se cuantificó la velocidad de conducción del componente A del PAC al dividir la longitud del nervio, entre los electrodos de registro y de estimulación, con la latencia de aparición del potencial.

Los datos obtenidos en esta serie de observaciones fueron sometidos a la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para determinar las

posibles diferencias entre grupos experimentales y tratamientos (Zar, 1974).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Efecto de la desnutrición o la malnutrición sobre la mecánica contráctil de músculos esqueléticos:

En esta parte del estudio, observamos que el peso corporal y el peso húmedo de los músculos tibial y gastrocnemio de las ratas desnutridas y malnutridas, es considerablemente menor que el peso de las ratas y los músculos del grupo control. Estos resultados concuerdan con estudios previos en donde se emplean otros procedimientos de desnutrición y/o malnutrición (Segura, 1993; vease: Morgane, et al. 1978).

### I. Fuerza desarrollada durante una contracción simple.

Tanto el músculo gastrocnemio (mixto) como el músculo tibial (predominantemente rápido) de animales desnutridos y malnutridos desarrollan menor tensión por gramo de tejido húmedo, durante una sacudida simple, que los músculos de animales control (Fig. 1A y B).

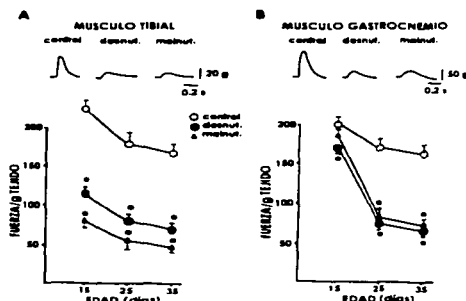


Fig. 1. Sacudida simple de los músculos tibial (A) y gastrocnemio (B). Se incluyen las gráficas de la fuerza desarrollada por gramo de tejido en relación a la edad postnatal de la cría.

Tal reducción de la fuerza contráctil de los músculos de animales desnutridos y malnutridos es compatible con la proposición de que las deficiencias alimenticias afectan tanto a los elementos contráctiles de las fibras musculares como al metabolismo de las mismas (Segura, 1993).



## 2. Duración de la contracción simple.

Por otra parte, la sacudida simple de los músculos tibial y gastrocnemio (Fig. 1A) de animales desnutridos y malnutridos (de 25 y 35 días de edad postnatal) presentan una latencia al pico y un tiempo de relajación mayores que las de los animales control (Fig. 2 A y B).

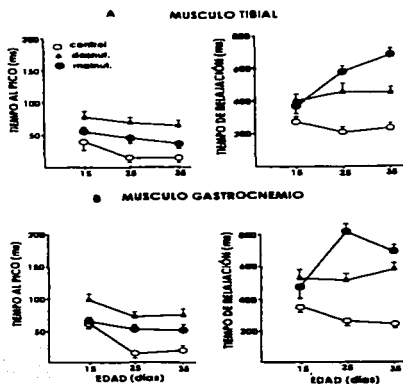


Fig. 2. Gráficas de la latencia al pico y del tiempo de relajación de la sacudida simple de los músculos tibial (A) y gastrocnemio (B), en relación con la edad postnatal de los animales control, desnutridos y malnutridos.

Nuestros resultados permiten sugerir que los músculos de animales desnutridos o malnutridos en desarrollo presentan características contráctiles semejantes a las de los músculos de sacudida lenta o rápidos, resistentes a la fatiga. Esto a su vez permite proponer que el desarrollo postnatal de las fibras musculares de contracción rápida se ve entretardado por la deficiencia alimenticia impuesta durante la gestación y la lactancia de las crías de los animales.

## 3.- Frecuencia de estimulación.

La aplicación de trenes de estímulos a frecuencias de 5 y 10 Hz. a los músculos tibial y gastrocnemio de animales desnutridos y malnutridos provocan una respuesta contráctil de menor o igual magnitud por gramo de tejido húmedo, que la generada en los músculos de ratas control (Fig. 3). Sin embargo, cuando se aplican trenes de estímulos a frecuencias de

20 Hz o mayores, los músculos de los animales desnutridos y malnutridos generan mayor tensión por gramo de tejido húmedo que los músculos de ratas control (Fig. 3). Asimismo, las respuestas contráctiles de los músculos de animales desnutridos y malnutridos se fusionan a una frecuencia de estimulación mayor que la de los animales control (Fig. 3).

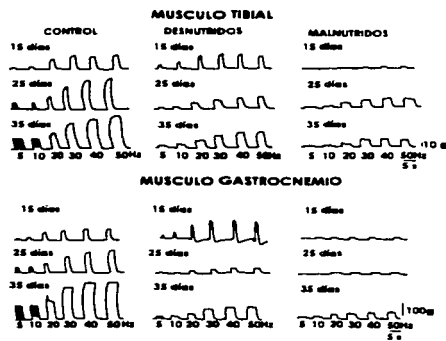


Fig. 3. Registros de la respuesta contráctil provocada por la estimulación repetida a frecuencias crecientes de los músculos tibial (A) y gastrocnemio (B). Note las diferentes escalas de tensión para cada uno de los registros.

Debido a que las fibras musculares de contracción rápida, pero resistentes a la fatiga, generan mayor tensión durante la estimulación tetánica que las fibras lentas o rápidas fatigables (Burke y cols, 1974), nuestras observaciones permiten sugerir que los músculos tibial y gastrocnemio de ratas con deficiencias alimenticias presentan una mayor proporción de fibras rápidas, resistentes a la fatiga que los músculos de animales control, de las tres edades registradas. Lo anterior podría evidenciar que la desnutrición o la malnutrición, provocadas durante la gestación y la lactancia de los animales, induce un retraso en el proceso de diferenciación de las fibras musculares de lentas a rápidas fatigables.

## 4. Relación tensión longitud del músculo.

El análisis de las curvas de tensión-longitud de los músculos en reposo (curvas de tensión pasiva) muestran que los músculos tibial y gastrocnemio de los animales desnutridos y malnutridos, de todas las edades

TRABAJO CON  
FALLA EN ORIGEN



estudiadas, desarrollan mayor tensión por gramo de tejido húmedo que los músculos de las ratas control. Sin embargo, la tensión activa que son capaces de desarrollar los músculos tibial y gastrocnemio de animales desnutridos y malnutridos de todas las edades, es menor que la generada por los músculos de ratas control. Puesto que las curvas de tensión pasiva permiten establecer el grado de participación de los elementos elásticos (tejido conectivo, tendones, etc.), presentes en los músculos durante la contracción, mientras que las curvas de tensión activa reflejan la participación de los elementos contráctiles (Hill, 1938), nuestros resultados podrían sugerir que los músculos tibial y gastrocnemio de las ratas sometidas a desnutrición y malnutrición durante la gestación y la lactancia, presentan un incremento en la cantidad de elementos elásticos en serie y una reducción de los elementos contráctiles. Esta suposición es apoyada por la observación realizada en un estudio previo (Segura, 1993) de que la desnutrición neonatal reduce drásticamente la concentración de proteínas totales del músculo gastrocnemio-soleo.

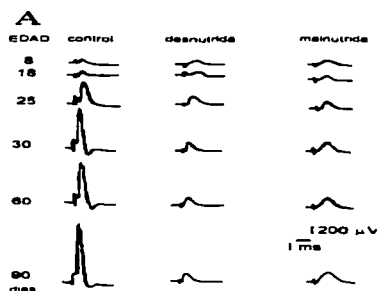
#### Efecto de la desnutrición o la malnutrición sobre la generación y propagación del PAC.

##### 1. Área del componente A del PAC.

La estimulación del nervio sural de los animales control, desnutridos y malnutridos, con pulsos de corriente eléctrica, de intensidad  $2-3 \times U$ , genera un potencial eléctrico de latencia breve, denominado componente A del PAC. Entre los 8 y 18 días de edad postnatal, la amplitud ni en el área del PAC de los nervios experimentales no presenta diferencias significativas con el de los nervios control (Fig. 4). Sin embargo, a partir de los 25 hasta los 90 días de edad, el PAC de los nervios de animales desnutridos y malnutridos es de considerable menor amplitud y área que el generado en los nervios de animales control, de las mismas edades (Anova  $p < 0.005$ ).

Nuestras observaciones permiten señalar que de los 25 hasta los 90 días de edad post-natal, el número de axones activados en el nervio sural de animales desnutridos y malnutridos, por un estímulo de intensidad supramaxima ( $2-3 \times U$ ) es considerablemente menor que el número de axones activados por el mismo tipo de estímulo pero aplicado a nervios control. Estas observaciones podrían explicarse si se plantea que la alimentación deficiente en calidad y/o calidad es capaz de producir, ya sea: a) una reducción en el número de fibras en el nervio sural debida a muerte axonal, o b) una inadecuada mielinización de los axones aferentes durante el desarrollo postnatal de las crías, lo que a su vez provocaría una malformación de los nodos de

Ranvier y a un bloqueo de la conducción del impulso nervioso; c) alteraciones en las propiedades eléctricas de los axones que podrían estar asociadas a cambios en la morfología (reducción del diámetro de los axones) o bien, iv) una reducción en la síntesis y/o incorporación de canales de sodio en la membrana axonal.



##### B

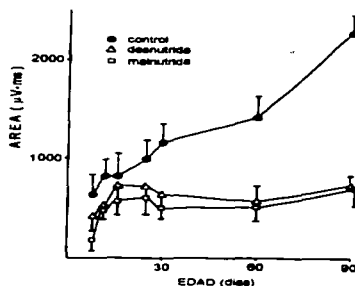


Fig. 4. A. Registros promedio ( $n=16$  muestras) del componente A del PAC registrado en nervios de animales control y desnutridos o malnutridos. B. Gráfica de la área del componente A del PAC con respecto de la edad postnatal de los animales control y experimentales.

Recientemente y en colaboración con el Dr. Horacio Merchant del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, hemos analizado algunas de las posibilidades anteriores mediante un estudio histológico de los nervios sural de ratas control y

experimentales de 30 días de edad. En ese estudio, determinamos que no existen diferencias significativas en el número de axones ni en el diámetro de los mismos entre los tres grupos de animales estudiados, pero sí se observan diferencias significativas en el grosor de la vaina de mielina de los axones de los nervios desnutridos y malnutridos con respecto a los nervios control (Fig. 5).

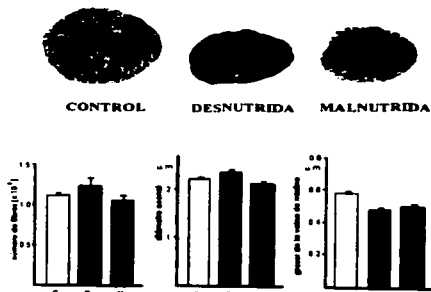


Fig. 5. Parte superior: Secciones transversales de nervios control, desnutridos y malnutridos, respectivamente. Parte inferior: Histogramas del número, diámetro y grosor de la vaina de mielina de axones, que muestran que los nervios de animales desnutridos y malnutridos no presentan diferencias significativas en el número (A) ni en el diámetro de los axones (B), pero tuvieron una reducción significativa en el grosor de la vaina de mielina (C).

En base a esta evidencia, resulta factible proponer que una de las probables causas de la aparente inexcitabilidad de las fibras aferentes del nervio sural esta asociada a una inadecuada mielinización de los axones, lo que a su vez probablemente afectaría la formación de los nodos de Ranvier y la distribución de los canales de  $\text{Na}^{++}$  en el espacio internodal (Bowe y cols.,1994), provocando un bloqueo en la conducción del potencial de acción.

## 2. Velocidad de conducción.

Considerando la latencia de aparición del componente A y la longitud de los nervios, se calculó la velocidad máxima de conducción de los axones activados por el estímulo de los nervios control, desnutridos y malnutridos. Entre los 8 y los 12 días de edad, la velocidad máxima de conducción del PAC de nervios desnutridos y malnutridos (Fig. 6) no presenta

diferencias significativas con los grupos control, pero a partir de los 18 hasta los 90 días los axones del nervio sural de las ratas control conducen el impulso nervioso a una velocidad ligeramente mayor que la de los nervios experimentales (ANOVA  $p < 0.005$ ).

Nuestros resultados podrían indicar que en edades post-natales relativamente tempranas (8-16 días), aún no se ha completado la mielinización de los axones del nervio sural en los animales control y experimentales, lo que concuerda con observaciones previas que sugieren que la mielinización ocurre durante las primeras tres semanas de vida post-natal (Morgane, 1978).

Puesto que la velocidad de conducción del PAC depende en gran medida de la presencia y de las características de la vaina de mielina que rodea a los axones nerviosos, podría suponerse que el decremento promedio en la velocidad de conducción del PAC en el nervio sural de animales desnutridos desde los 18 hasta los 90 días de edad (Fig. 6) resulta de un entlentecimiento del desarrollo postnatal de los procesos de depósito y compactación de la mielina en los axones.

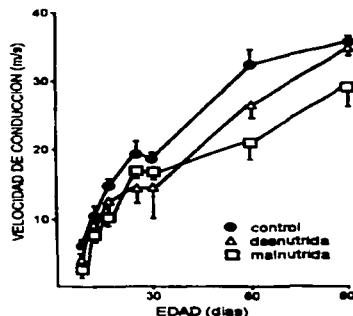


Fig. 6. Velocidad de conducción del PAC registrado en el nervio sural de animales control y con deficiencias alimenticias con respecto a la edad postnatal.

Esta hipótesis es apoyada por investigaciones previas en las que se ha observado que los axones que constituyen el nervio ciático de ratas sometidas a desnutrición neonatal, presentan una reducción importante en el grosor de la vaina de mielina (Clos y Legrand, 1970; Hedley-White y Meuser, 1971) y en el número de lamelas que rodean a las fibras nerviosas (Sima, 1974 B), así como la realizada recientemente por nuestro grupo de trabajo (vease párrafo anterior).

159

TESIS CON  
REGISTRO EN  
BIBLIOTECA NACIONAL

### 3. Umbral.

Entre los 8 y 16 días de edad, la intensidad mínima de corriente eléctrica necesaria para activar las fibras nerviosas más excitables de los nervios sural de animales desnutridos o malnutridos es considerablemente mayor (ANOVA  $p < 0.005$ ) que la necesaria para excitar el mismo tipo de fibras pero de nervios de ratas control. En cambio, de los 18 a los 90 días de edad postnatal se presenta un ligero incremento (aunque no significativo) en el umbral de activación de las fibras más excitables en los nervios desnutridos y malnutridos con respecto a los nervios control (Fig. 7).

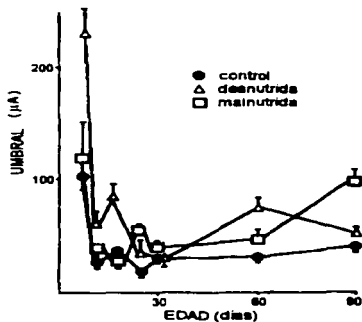


Fig. 7. Umbral de activación de los axones más excitables de los nervios de animales control y experimentales en distintas edades postnatales.

Nuestros resultados podrían explicarse si se considera que en edades post-natales tempranas, las fibras aferentes que constituyen el nervio sural de las ratas sometidas a desnutrición o malnutrición perinatal y que sí pudieron ser activadas por el estímulo aplicado, poseen un diámetro inferior al de los axones de los animales control o bien, que la cantidad de canales de sodio en la membrana de las fibras nerviosas fuese insuficiente para generar potenciales de acción (Aidley, 1989).

La observación de que en edades tempranas (entre 8 y 16 días post-natales), la intensidad de corriente eléctrica necesaria para activar los axones del nervio sural de las ratas desnutridas y malnutridas es mayor que la necesaria para excitar los axones de los animales control (Fig. 7), podría explicarse si se considera que en esas edades, los axones desnutridos presentan una disminución en su diámetro. Esta

posibilidad concuerda con observaciones realizadas por Sima (1974A), quien reportó una reducción importante en el diámetro de los axones que conforman el nervio ciático de ratas desnutridas de 90 días de edad. Sin embargo ello no concuerda con el estudio histológico realizado recientemente por nosotros en el nervio sural de animales desnutridos y malnutridos de 30 días de edad (veanse párrafos previos). En forma alternativa y debido a que la excitabilidad de las fibras nerviosas no solo depende del diámetro, sino también del número de canales iónicos presentes en la membrana (Rogart y Ritchie, 1977), podría proponerse que en los animales desnutridos o malnutridos, el número de canales de sodio por unidad de área de membrana axonal es menor que en la membrana de los axones de nervios control.

Como conclusión, a partir de los resultados obtenidos en este estudio podemos establecer que una alimentación deficiente en cantidad y/o calidad altera significativamente las propiedades funcionales de los músculos y nervios periféricos en la rata en desarrollo. Es importante señalar la conveniencia de estudiar con mayor profundidad aquellos procesos fisiológicos particulares que sean mayormente afectados por la desnutrición o la malnutrición, por ejemplo, analizar las posibles alteraciones que produzca una alimentación deficiente sobre los campos sensoriales periféricos (en la piel) y centrales (médula espinal), así como establecer los posibles paradigmas a seguir para la restauración parcial o total de las funciones musculares y nerviosas afectadas por la desnutrición o malnutrición perinatal durante el desarrollo postnatal de los animales.

### REFERENCIAS

- The physiology of excitable cells. Ed. Aidley, D.J. 1989 (Cambridge Univ. Press.) pp. 16-20.  
Bedi, K.S. (1994). *J. Comp. Neurol.* 324: 596-602.  
Biostatistical Analysis. Ed. Zar, J.H. (Prentice-Hall, Englewood Cliffs), pp.121-124.  
Bowe, C.M., Johanson, C.S., Hildebrand, C. & Evans, N.H. (1994). *Dev. Brain Res.* 79: 186-194  
Burke, R.E., Levine, D.N., Salkmann, M. & Tsairis, P. (1974). *J. Physiol. (Lond.)* 238: 503-514.  
Chow, B.F. & Lee, C.J. (1964). *J. Nutr.* 82: 10-18.  
Clos, J. & Legrand, J. (1970). *Brain Res.* 22: 285-297.  
Close, R. (1964). *J. Physiol.* 173: 74-95.  
Goldspink, G. & Ward, P.S. (1979). *J. Physiol.* 296: 453-469.  
Hedley-White, E.T. & Meuser, C.S. (1971). *Lab. Invest.* 24: 156-161.  
Hill, A. V. (1938). *Proc. R. Soc. Lond. B* 126: 136-195.  
Howart, R.E. (1972). *J. Nutr.* 102: 971-973.  
Huxley, A.F. & Niedergengerke, R. (1954). *Nature* 173: 971-976.

160

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Komisaruk, R.B., Adler, N.T. & Hutchinson, J. (1972). *Science* 178: 1295-1298.
- Lopes, J., Russell, D.M., Whitwell, B.S. & Jeejeeboy, K.N. (1982). *Amer. J. Clin. Nutr.* 36: 602-610.
- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, E. & Resnick, O. (1978). *Neurosc. and Biobehav. Rev.* 2: 137-230.
- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R.J., Bronzino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T. & Galler, J.R. (1993). *Neurosc. and Biobehav. Rev.* 17: 91-128.
- Physiology and Biophysics. Eds. Ruch, T.C. & Patton, H.D. 1965 (Saunders, Philadelphia). pp. 73-94.
- A colour atlas of the anatomy of small laboratory animals. 2: rat, mouse, golden hamster. Eds. Popesko P., Rajtova, V. & Horák, J. 1990 (Wolfe Publishing, Ltd.) . pp. 93-94.
- Robain, O. & Ponsot, G. (1978). *Brain Research* 149: 379-397.
- Rogart, R.B. & Richie, J.M. In: Myelin. Ed. Morell, P. (Plenum Press). pp. 117-159.
- Russell, D., Walker, P., Leiter, L., Sima, A., Tanner, W., Mickle, D., Whitwell, J., Marliss, E. & Jeejeeboy, K.N. (1984 A). *Am. Clin. Nutr.* 39: 503-513.
- Russell, D., Atwood, H., Ehittaker, S., Itakura, I., Walker, M., Mickle, D. & Jeejeeboy, K. (1984 B). *Clin. Science.* 67: 185-194.
- Segura, B. (1993). Tesis de Maestria. CINVESTAV, IPN. Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. 105 pp.
- Sima, A. (1974 A). *Acta Physiol. Scand. suppl.* 406: 3-55.
- Sima, A. (1974 B). *Acta Physiol. Scand. suppl.* 410: 3-38.
- Sys, P.K., Ranson, B.R. & Waxman, S.G. (1991). *Brain Res.* 546: 18-32.
- Waterlow, J.C. & Stephen, J.M.L. (1969). *Proc. Nutr. Soc.* 28: 234.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN