



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN CRÓNICA SOBRE LA MECÁNICA
CONTRÁCTIL Y LA PROPORCIÓN DE TIPOS DE FIBRAS DEL MÚSCULO
EXTENSOR *DIGITORUM LONGUS* (EDL) DURANTE EL DESARROLLO
POSNATAL DE RATAS HEMBRAS Y MACHOS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. JAVIER PEREYRA VENEGAS

DIRECTOR DE TESIS
DR. ISMAEL JIMÉNEZ ESTRADA
IFC-UNAM, CINVESTAV

COMITÉ TUTOR
DRA. MARGARITA MARTINEZ GÓMEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. ALICIA ORTEGA AGUILAR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO. MARZO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

i.- AGRADECIMIENTOS

Por este conducto, hago manifiesto mi sincero agradecimiento y doy las gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el apoyo económico otorgado (No. De beca **336059**). Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas del Instituto de Fisiología Celular (**IFC**) de la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**) mi alma mater, por haberme dado la oportunidad de obtener una sólida formación científica y un desarrollo humano y espiritual que cambio para bien mi vida y la de mi familia. Al departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzado (**CINVESTAV**) por permitirme usar sus instalaciones para desarrollar la parte experimental de este estudio.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Ismael Jiménez Estrada, por su paciencia e incondicional apoyo en la dirección de la presente tesis A los integrantes de mi comité tutorial Dra. Alicia Ortega Aguilar y a la Dra. Margarita Martínez Gómez por su apoyo académico y consejos durante el desarrollo de mi proyecto de investigación. A la Dra. Bertha Segura Alegría por su amistad e invaluable aportes durante el desarrollo de esta investigación, A la Química Silvia Mariscal Tovar por su apoyo en la aplicación de las técnicas de histoquímica utilizadas. Al técnico especializado en investigación, José Carlos Guadarrama Olmos, por su amistad y apoyo en el diseño de algunos equipos y aparatos empleados durante esta investigación y además por el esmerado cuidado otorgado a los animales de experimentación utilizados.

DEDICATORIA

Asimismo, deseo dedicar esta tesis:

A mi esposa, María de Lourdes Zamudio Guzmán por su amor, comprensión y apoyo.

A mis hijos, Mónica Citlalli y Javier Eduardo porque su sonrisa y cariño me han llenado de ánimo y fuerza durante los momentos difíciles de mi vida.

A mis padres, a quienes debo este logro profesional, por todo su trabajo y dedicación, aunque ya no estén conmigo.

A mis hermanos, por su apoyo y cariño.

A mi entrañable amiga, QFB Delia Aguilar Gámez, por su inestimable amistad.

Shemá Yisrael,

Adonay Elohenu

Adonay Ejad.



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Importancia del músculo esquelético en la economía corporal	4
1.2. Características generales de los músculos esqueléticos	4
1.3. Características estructurales de las fibras musculares	4
1.3.1 La fibra muscular	5
1.3.2. El sarcómero y su ultraestructura	6
1.3.3. Tipos de fibras musculares	10
1.3.3.1. Fibras lentas oxidativas (SO)	12
1.3.3.2. Fibras rápidas glucolíticas (FG)	12
1.3.3.3. Fibras con metabolismo mixto (rápidas-oxidativas-glucolíticas, FOG)	12
1.3.4. Clasificación histoquímica de las fibras musculares	13
1.4. Desarrollo embrionario del sistema muscular	15
1.5. La contracción muscular	18
1.5.1. El papel del calcio en la contracción muscular	19
1.5.2. Tipos de contracción muscular	22
1.5.3. Teoría del deslizamiento de los filamentos y ciclo de los puentes cruzados	23
1.5.4. Modelo mecánico del músculo esquelético	27
1.5.5. Curvas de tensión-longitud y estado activo	29
1.5.6 Factores que pueden afectar la respuesta contráctil de los músculos	30
2. ANTECEDENTES	32
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
5. HIPÓTESIS	43
6. OBJETIVO GENERAL	43
6.1 Objetivos Particulares	43
7. MATERIAL Y MÉTODOS	44
7.1. Animales	44
7.2. Análisis histoenzimático del músculo	45
7.3. Análisis de la sacudida simple y tetánica del músculo	47
7.4. Análisis del porcentaje de peso y músculos EDL	49

8.	RESULTADOS	49
	8.1. Peso corporal y peso del músculo EDL	49
	8.2. Requerimientos de energía	51
	8.3. Composición de tipos de fibras de los músculos EDL de machos y hembras	53
	8.4. Respuesta contráctil del músculo EDL de ratas machos y hembras	61
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
10.	CONCLUSIONES	73
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
12.	PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS	85
	12.1 Artículo Original	85
	12.2. Presentación en Congreso Nacional	85
13.	ANEXOS	86
	13.1. Anexo 1. La desnutrición y el balance Redox en los músculos esqueléticos.	86
	1.3.2. Anexo 2. Características anatómicas del músculo Extensor <i>Digitorum Longus</i> (EDL).	87
	13.3. Anexo 3. Composición química del alimento formulab 5008 (tabla 8)	90
	13.4. Anexo 4. Listado de figuras y tablas.	91

ii.- RESUMEN.

Poco se ha estudiado acerca del efecto que produce un bajo consumo de alimento sobre el desarrollo de las características estructurales y funcionales de los músculos rápidos de las extremidades posteriores de ratas hembras y machos. Por lo que el objetivo del presente estudio fue establecer las consecuencias que provoca la privación crónica y severa (pre y posnatal) de alimento (~50%) sobre el número total y la proporción relativa de los distintos tipos de fibras rápidas y la respuesta contráctil del músculo Extensor Digitorum Longus (EDL) de ratas hembras y machos en diferentes edades posnatales (de la lactancia a la etapa adulta). Los resultados obtenidos muestran que los músculos EDL, tanto de ratas hembras como de machos desnutridos, no presentan diferencias significativas en cuanto al número total de fibras con respecto a los músculos EDL de los animales controles en etapas tempranas y de adulto joven. Sin embargo, los músculos EDL de ratas adultas (de 365 días de edad) desnutridas, de ambos géneros, mostraron una disminución significativa en el número total de fibras respecto a los músculos controles. Por otro lado, los músculos EDL de ratas macho desnutridos de 20, 30 y 40 días posnatales, presentaron una mayor proporción de fibras tipo IIB que de tipo IIA y desarrollan mayor fuerza contráctil (normalizada con respecto al peso húmedo del músculo) que los músculos de animales macho controles. Sin embargo, debe señalarse que la mayor producción de fuerza que desarrollaron los músculos EDL de los machos desnutridos durante una sacudida simple ocurre a partir de los 20 días de edad y se prolonga hasta los 365 días de edad. En contraste, las respuestas contráctiles de los músculos EDL de ratas hembras desnutridas no presentaron diferencias significativas con respecto a las observadas en las ratas controles, ni en la proporción de los distintos tipos de fibras, en la mayoría de las edades analizadas.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los músculos EDL de los machos desnutridos son más susceptibles a los efectos ejercidos por el bajo consumo crónico de alimento que los músculos EDL de las ratas hembras. Además, se sugiere la existencia de un proceso más complejo que la simple relación entre la proporción de tipos de fibras rápidas y la fuerza normalizada en los músculos EDL de las ratas macho desnutridos en la que estarían incluidas otras variables, tales como las características morfométricas (por ej.: longitud de la sacomera) y funcionales (por ej.: cantidad de Ca^{++} intrafibra disponible para la contracción) de las fibras que integran a los músculos EDL de las

ratas macho desnutridas, así como factores hormonales, en los que posiblemente los estrógenos pueden tener un papel protector en los músculos EDL de las ratas hembras desnutridas.

iii.- SUMMARY

Practically there is not information about the influence that undernourishment exerts on the structural and functional characteristics of skeletal muscles during the postnatal development of female and male rats. The aim of this study was to analyze the effects of pre and postnatal low-food consumption (~50%) on the total number and relative proportion of fiber types and contractile responses of the Extensor Digitorum Longus (EDL) muscle in female and male rats at different postnatal ages (from infancy to adulthood). The results obtained indicate that EDL muscles from both male and female rats, did not present changes in the total number of fibers with respect to controls at early postnatal ages and in the young adult. However, EDL muscles from undernourished elderly rats (365 days of age) of both genders showed significant reductions in the number of fibers than control ones. In addition, EDL muscles from undernourished male rats with 20, 30 and 40 days of age showed a higher proportion of type IIB fibers than type IIA but larger twitch force responses (normalized with respect to the muscle wet weight) than EDL muscles from control males were observed at practically all ages (between 20 and 365 postnatal days of age). In contrast, EDL muscles from control and undernourished female rats showed no significant differences in the proportion of fiber types and normalized force in most of the postnatal ages analyzed.

The results obtained in this thesis indicate that EDL muscles of undernourished males are more susceptible to the effects exerted by a chronic low food intake than EDL muscles from female rats. It is suggested the probable existence of a more complex process than the simplistic relationship between the proportion of muscle fiber types and the normalized twitch force of EDL muscles from undernourished male rats. In such process it could be involved other morphometric (i.e.: sarcomere length) or functional (i.e.: calcium availability) characteristics in the fibers composing the EDL muscle of undernourished male rats. It is also suggested that estrogens may have a protective role on the EDL muscles from rats undernourished females.

ABREVIATURAS:

MC, machos controles; MD machos desnutridos; HC, hembras controles; HD, hembras desnutridas; EDL, Extensor Digitorum Longus; AT, área transversal total ocupada por todas las fibras; AI, área transversal del músculo ocupada por fibras Tipo I; AIIA área transversal del músculo ocupada por fibras Tipo IIA; AIIB área transversal del músculo ocupada por fibras Tipo IIB; PN, edad posnatal; MLC, cadena ligera de miosina; MHC, cadena pesada de miosina; ERO, especies reactivas de oxígeno. TMB, tasa metabólica basal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del músculo esquelético en la economía corporal

Debido a sus propiedades mecánicas y su diversidad, los músculos esqueléticos (existen aproximadamente 600 músculos individuales en los humanos (Maltin, 2008)), participan en una gran variedad de funciones corporales, entre las que destacan, la locomoción, la ventilación pulmonar, el mantenimiento de la postura, la expresión facial, la cópula, etc. Además, el músculo esquelético como tejido juega un papel sobresaliente en la regulación del metabolismo energético de los organismos ya que representa el 20% del gasto total de energía, almacena glucógeno en mayor proporción que el hígado, es el principal sitio de oxidación de los ácidos grasos, es el principal tejido estimulado por la insulina por lo que está estrechamente involucrado en la captura de glucosa sanguínea y además destaca como reserva de aminoácidos, entre otras funciones (Brameld, 2004; Wolfe, 2006).

1.2. Características generales de los músculos esqueléticos

Los músculos se clasifican de acuerdo a su morfología y función en músculo liso y estriado, éste último se subdivide a su vez en cardíaco y esquelético. Genéricamente el tejido muscular esquelético está formado por un conjunto de músculos que forman el tejido más abundante del organismo, con alrededor del 45% del peso corporal total en los mamíferos (Mattiuzzi, 2000; Bissonnette, et al.1997); pero en algunos casos representa hasta el 60% del peso corporal (Maltin, 2008).

Cada músculo esquelético, está constituido por conjuntos de fibras multinucleadas, cuyo origen ontogenético resulta de la fusión de varias células alargadas mononucleadas llamadas mioblastos, las cuales se encuentran unidas entre sí por tejido conectivo (Kandel, 1997). Este tipo de músculo se inserta en los huesos del esqueleto mediante tendones, razón por la cual se les ha denominado esquelético, y cuya principal característica funcional es la contracción, mediante la cual genera fuerza o tensión y trabajo mecánico.

El sistema muscular es único en su arquitectura y complejidad. Cada músculo es diferente a los demás (Pette y Staron, 1990), dada su posición anatómica y porque están constituidos por distintos fenotipos de fibras, y su proporción varía de músculo a músculo (según la función que desempeñan en las articulaciones u órganos).

1.3. Características estructurales de las fibras musculares

1.3.1. La fibra muscular

Las características fenotípicas de las fibras musculares son resultado de la expresión de programas endógenos específicos, particulares a cada una de ellas y que son modulados por una amplia variedad de influencias exógenas y endógenas (Bassel-Duby y Olson, 2006; Pette, 2006). Las fibras musculares son células alargadas multinucleadas, más o menos cilíndricas, con un diámetro de entre 10 y 100 μm y de longitud variable, que va desde algunos milímetros hasta varios centímetros, y cuyos extremos se fusionan con los tendones. Las fibras musculares organizadas en fascículos, están contenidas por una cubierta de tejido conectivo llamada perimisio, mientras que el músculo completo se encuentra envuelto por una capa de tejido conectivo, denominada epimisio o *fascia* (Keynes y Aidley, 1985). Cada fibra muscular presenta en su periferia una membrana plasmática individual llamada sarcolema y la matriz extracelular, el endomisio o lámina basal (formada por las membranas celular y basal), con una gran cantidad de pliegues e invaginaciones, los cuales conforman el sistema de túbulos transversos (TT); de 0,1 μm de diámetro en promedio). Este sistema de túbulos asegura que un potencial de acción, pueda extenderse por todo el interior de la fibra. La despolarización de la membrana plasmática provoca la liberación de Ca^{2+} de su principal reservorio, el retículo sarcoplásmico (RS), el cual es un conjunto de túbulos anastomosados entre sí, que envuelve a las miofibrillas y que ocupa el 10 % del volumen de la fibra (Darnell, et al. 1990; Mattiazzi, 2000). La liberación del Ca^{2+} del RS incrementa la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intracelular lo que conduce a la contracción del músculo (Franzini-Armstrong, 1970; Kandel, 1997).

La membrana basal (20 a 100 nm de grosor) está conformada por moléculas de colágeno tipo IV, laminina y fibronectina. Esta membrana sirve como sustrato a la lámina reticular externa la cual está formada por colágeno tipo V, fibronectina y otras proteínas fibrilares. Estas dos cubiertas constituyen el soporte estructural de las fibras musculares y contribuyen por sus propiedades elásticas en el ciclo de la contracción-relajación (Mattiazzi, 2000).

Cada una de las fibras del músculo, está compuesta por una serie de subunidades arregladas en forma paralela, denominadas miofibrillas, que se encuentran rodeadas por el citoplasma, en donde se encuentran gránulos de glucógeno, mitocondrias y pequeñas células satélite (consideradas mioblastos latentes). Las miofibrillas presentan un

diámetro aproximado de 1-2 μm y una longitud similar a la de la fibra muscular. Cada miofibrilla está constituida por unidades repetitivas ubicadas en serie, llamados sarcómeros, y que representan la unidad morfo-funcional del músculo (Ganong, 1994; Schiaffino, y Reggiani, 1996).

1.3.2. El sarcómero y su ultraestructura

La fibra muscular como las miofibrillas presentan un patrón de estriación característico, formado por bandas que se observan a lo largo del eje longitudinal de las fibras y miofibrillas, que dieron origen al nombre de músculo estriado. Las bandas oscuras "A" (anisotrópicas) están conformadas por filamentos de las proteínas actina y miosina (filamentos delgados y gruesos), que presentan un alto índice de refracción con respecto a las bandas claras, llamadas bandas "I" (isotrópicas). En medio de la banda anisotrópica ("A"), se observa una zona más clara que la divide, la banda "H" que contiene solo filamentos gruesos, en cuyo centro se encuentra la línea "M" donde se concentran enzimas del metabolismo energético como la creatina-cinasa (Randall, et al. 2002; Schiaffino y Reggiani, 2011). En medio de la banda clara ("I") se localiza la línea o disco "Z", la cual se encuentra a 2 μm de la siguiente línea "Z"; de modo que estas líneas delimitan al sarcómero (Huerta, et al. 1986). Los sarcómeros pueden ser definidos como un sistema de filamentos gruesos y delgados, interdigitados y separados entre sí por una distancia aproximada de 26 nm (Figura 1).

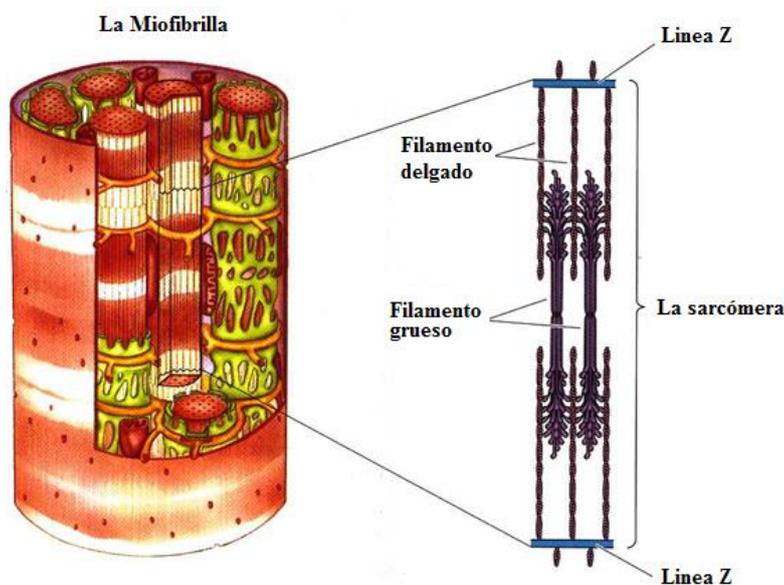


Figura 1.- Ultraestructura de una miofibrilla y un sarcómero. Se observan los filamentos delgados y gruesos y los límites del sarcómero representados por las líneas zeta (Modificado de [Bear, et al. 2001](#)).

Ultraestructuralmente, los filamentos gruesos del sarcómero tienen una longitud de 1.55 μm y un diámetro de 15 nm. Están compuestos por una proteína contráctil llamada miosina, que al tratarse con la enzima proteolítica tripsina se separa en dos proteínas: la meromiosina ligera (MLC; por sus siglas en inglés) y la meromiosina pesada (MHC; por sus siglas en inglés). La miosina es una molécula (PM: ~ 500 kDa) que funciona como una ATPasa, es decir, hidroliza enzimáticamente el ATP para formar ADP y pirofosfato (Pi), esta reacción es activada por el Ca^{2+} y es inhibida por el Mg^{2+} . Morfológicamente, la miosina es una molécula con forma de bastoncillo, de cuello flexible y una cabeza globular (de meromiosina pesada) que se proyecta hacia afuera y una cola (de meromiosina ligera) orientada al centro del filamento ([White, et al. 2000](#)). La cabeza de la molécula con actividad de ATPasa conforma la base molecular del puente cruzado. Cada molécula de miosina es un hexámero compuesto de dos cadenas pesadas (MHC) y cuatro cadenas ligeras (MLC).

Las cadenas pesadas y ligeras están ensambladas formando dos cabezas globulares con una larga cola, cada cabeza globular está compuesta del sub-fragmento S1 (cadena pesada de miosina) y dos cadenas ligeras diferentes de miosina (una de 25 kDa llamada esencial y otra de 20 kDa llamada regulatoria) el sub-fragmento S1 contiene un sitio catalítico en donde se une e hidroliza el ATP, así como un sitio para unirse a la actina en el filamento delgado ([Stevens et al. 2006](#)).

Los filamentos delgados tienen una longitud de $1\mu\text{m}$ y un diámetro de 5-6 nm, se originan en las líneas "Z" ([Aidley, 1978](#)) y se extienden de manera longitudinal hacia el centro del sarcómero a lo largo de la banda "I" hasta penetrar en la banda "A", donde se intercalan con los filamentos gruesos. Los filamentos delgados están compuestos por la proteína globular, la G-actina, que se polimeriza en solución salina y forma un filamento en forma de hélice, llamado F-actina ([Pette y Staron, 1990](#)), la cual representa el 20% de la proteína miofibrilar y el 12% de la proteína total del músculo. Las moléculas de F-actina se encuentran en el filamento delgado en forma de dos cadenas de cuentas enrolladas entre sí, de manera helicoidal. Las dos hebras se entrecruzan entre sí cada 36,5 nm y están unidas en uno de sus extremos al disco Z. En los surcos de las

hélices de F-actina se encuentran moléculas filamentosas de una proteína denominada Troponina (35 kDa), y aproximadamente a cada 40 nm de distancia, se encuentran complejos proteicos conformados por 3 proteínas globulares unidas, que en conjunto se denominan Troponina; la proteína más pesada de este complejo es la denominada Troponina T, (PM: 26-31 kDa), mientras que la segunda proteína es la Troponina I (PM: 21 kDa) y la tercera proteína es la Troponina C (PM: 18 kDa) (Ganong, 1994). Cabe aclarar que cada tipo de Troponina T, I y C presentan varias isoformas que desempeñan funciones específicas.

Cuando el músculo está en reposo, el complejo proteico troponina-tropomiosina mantiene inhibida la interacción de la actina con la miosina mediante la unión de la troponina I a la actina, lo que inhibe la actividad de la ATPasa de la miosina. Pero cuando un potencial de acción provoca un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en el sarcoplasma de la fibra, entonces tal catión se une a la proteína censora de Ca^{2+} (la Troponina "C") en los sitios III y IV, que se caracteriza por su gran afinidad al Ca^{2+} y por su baja especificidad. Durante el reposo, los sitios de la Troponina C se encuentran ocupados por el ión Mg^{2+} , al mismo tiempo que los iones Ca^{2+} están acoplados a los sitios reguladores de baja afinidad de la troponina C, denominados I y II. La unión del Ca^{2+} a los sitios mencionados de la proteína censora, después de un potencial de acción, provoca que el filamento de tropomiosina se mueva de su posición de bloqueo a una posición de no bloqueo (localizado en el surco de la doble hélice de actina) permitiendo que las cabezas de miosina se acerquen a la actina y se establezcan uniones, denominadas **puentes cruzados**, los que producirán la actividad contráctil del músculo mediante ciclos de unión-desunión (Gordon, Homsher y Regnier, 2000).

En los músculos esqueléticos se presenta una extensa variedad de isoformas de cadenas pesadas de miosina (MHC), entre las que se conocen al menos 10 isoformas diferentes en los mamíferos adultos (Tabla 1; Stevens, et al. 2006; d'Albis y Butler-Browne, 1993). Sin embargo, se han identificado nuevas variantes de la molécula de la MHC de tipo lento en músculos de la quijada del gato y de fetos de rata, además de otras isoformas de MHC rápidas observadas en el hámster sirio (D'Albis y Butler-Browne, 1993; Schiaffino y Reggiani, 2011). Asociadas con las MHC, se encuentran diversas isoformas de cadenas ligeras de miosina (MLC) de tipo lento (MLC1s, MLC2s) y de tipo rápido (MLC1f, MLC2f, MLC3f) (Steven, et al. 2006). Ambas isoformas MHC y MLC determinan la función contráctil del músculo esquelético (Schiaffino y Reggiani, 2011).

Además de la variabilidad de las MHC, se ha demostrado la existencia de una variedad de isoformas de las proteínas del complejo troponínico, tales como, la troponina "C" lenta (TnCs) y rápida (TnCf), las cuales muestran distinta sensibilidad al Ca^{2+} (Schiaffino y Reggiani, 1996). En la actualidad también se conocen varias isoformas de la troponina "I" (TnIs, TnIf, TnIc), de la troponina "T" (TnTs, TnTf), de la tropomiosina y de otras moléculas miofibrilares que posiblemente influyan en el número de puentes cruzados formados entre los filamentos gruesos y delgados y por lo tanto en la magnitud de la fuerza desarrollada y en la velocidad de contracción de las fibras musculares.

Tabla 1.- Principales isoformas de cadenas pesadas de miosina (MHC) identificadas en músculos esqueléticos de diversas especies. (Modificada de D'Albis y Butler-Browne, 1993; Schiaffino y Reggiani, 2011).

ISOFORMAS DE (MHC)	MÚSCULO (donde fueron sido identificadas)
Un tipo de MHC lenta (Tipo I).	Músculos de las extremidades y diafragma de ratas, ratones, humanos (Adultos)
Tres tipos de MHC rápidas (Tipo IIA, IID/IIX, IIB).	Músculos de las extremidades de ratas, ratones, conejos, humanos (Adultos)
Un tipo de MHC embrionaria MHC-Emb. (E).	Identificadas durante el desarrollo embrionario y primeras semanas de vida, en fibras en regeneración y ocasionalmente en músculos extra oculares y otros como el masetero y el tímpano en ratas, ratones y humanos.
Un tipo de MHC Perinatal (P) Dos tipos de MHC súper rápidas (IIM y EOM)	Igual que las fibras embriónicas o embrionarias Descritas en músculos extra oculares y de la quijada en gatos y perros.
Un tipo de MHC lenta tónica . MHC-slow/tonic	Comunes en fibras poliinervadas de anfibios y aves. Raras en músculos lentos extra-oculares tónicos de ratas y en músculos que cierran la quijada.
Un tipo de MHC cardiaca (α-cardiaca)	Identificadas en músculos masticatorios de la quijada en conejo y humano (y corazón)
Un tipo MCH β -slow	Se expresa en músculos lentos y en corazón

Modificada de D'Albis y Butler-Browne, 1993; Schiaffino y Reggiani, 2011

Diversos estudios han establecido que la secuencia de expresión de las isoformas de las cadenas pesadas de miosina (MHC) durante el desarrollo de los músculos de los animales, influye de manera predominante en la expresión de las propiedades contráctiles de los músculos esqueléticos ([Pette y Staron 2000](#)). Por ejemplo, se sabe que la expresión de las isoformas de MHC están asociadas a etapas específicas del desarrollo de los organismos: Las isoformas MHC- β (lenta I), MHC-2A, MHC-2X y la MHC-2B son isoformas predominantes en los músculos esqueléticos de mamíferos adultos. Mientras que las isoformas embrionaria (MHC-Emb) y neonatal (MHC-Neo) (Figura 3) son predominantes en el músculo esquelético de animales durante estadios tempranos del desarrollo ([Brozanski, et al., 1991](#)).

Además de las proteínas contráctiles y reguladoras que conforman los filamentos delgados y gruesos mencionados, existen en los músculos esqueléticos otras proteínas asociadas a los sarcómeros, tales como la Titina (denominada inicialmente Conectina) y la Nebulina. Los filamentos de Titina se unen en el centro del sarcómero a los filamentos gruesos, luego se extienden dentro de la banda "I" hasta llegar a los discos "Z" donde se fijan y sirven como ancla de los filamentos gruesos. Desde el punto de vista funcional, se ha sugerido que las propiedades elásticas de las isoformas de Titina son en parte responsables de la relación longitud-tensión en reposo del músculo esquelético, la destrucción de la Titina por radiación ionizante o digestión por tripsina ha mostrado decremento de la fuerza isométrica ([Bottinelli, 2001](#)). Por otro lado, estructuralmente los filamentos de la nebulina, se encuentran estrechamente asociados con los filamentos delgados y se extienden desde su inserción en la línea "Z" hasta el extremo libre del filamento delgado, determinando la longitud del filamento delgado ([Schiaffino y Reggiani, 1996](#); [Mattiuzzi, 2000](#)).

1.3.3. Tipos de fibras musculares

La manera en que se clasifican a los músculos y a las fibras musculares fue modificándose históricamente de acuerdo a lo que se avanzaba en el conocimiento de la estructura y función de dicho tejido. Una de las primeras formas de clasificar a los músculos fue por su coloración, así los músculos esqueléticos se dividieron inicialmente en oscuros (rojos) y pálidos (blancos). Pero poco después, cuando se observó la relación entre el color y la velocidad para contraerse y relajarse, los músculos fueron clasificados como rápidos y lentos ([Schiaffino y Reggiani, 2011](#)). Al descubrirse que los músculos

esqueléticos de los vertebrados e invertebrados se encuentran compuestos por diferentes tipos de fibras (Goldspink, 1999) y tras lograr determinar la forma cómo se contraen, éstas fueron clasificadas en dos grupos principales: a) El grupo de fibras musculares fásicas o de sacudida y b) El grupo de fibras musculares tónicas.

Cuando se activa o estimula a las fibras de sacudida, éstas son capaces de desarrollar tensión pero cuando su estimulación cesa, se relajan, por lo que se afirma que este tipo de fibras se contraen de manera fásica (en respuesta a la activación nerviosa o por la estimulación eléctrica del músculo, Tabla 2). En contraste el grupo de fibras de los músculos tónicos (presentes en invertebrados que no responden en forma de todo o nada, (Biewener, 2003) son fibras lentas que pueden mantener su tensión por largos períodos de tiempo, incluso cuando la activación neural ha terminado. Como resultado de tal comportamiento, las fibras de los músculos tónicos son adecuadas para mantener la tensión por períodos prolongados de tiempo, con bajos costos energéticos (por ejemplo: el músculo abductor de los bivalvos (Biewener, 2003).

PROPIEDADES DE LAS FIBRAS FASICAS EN LOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE LOS MAMIFEROS

Propiedad	Oxidativa (Tipo I)	Oxidativa rápida (Tipo IIA)	Oxidativa rápida (Tipo IIB)
Velocidad de contracción (V-máx)	Lenta	Rápida	Rápida
Actividad ATPasa de la miosina	Baja	Alta	Alta
Resistencia a la fatiga	Alta	Intermedia	Baja
Capacidad de fosforilación oxidativa	Alta	Alta	Baja
Enzimas para la glucólisis anaerobia	Baja	Intermedia	Alta
Numero de mitocondrias	Abundante	Abundante	Escaso
Diámetro de la fibra	Pequeño	Intermedio	Grande
Fuerza por área de la sección transversal	Baja	Intermedia	Alta

Tabla 2.- Muestra algunas de las propiedades diferenciales de las fibras fásicas de los músculos esqueléticos de mamíferos ([Modificada de Randall, et al. 2002](#)).

Cuando las técnicas bioquímicas permitieron un mejor conocimiento de la heterogeneidad metabólica de las fibras musculares de los mamíferos y de otros grupos taxonómicos, las fibras pudieron ser clasificadas en tres tipos básicos al combinar dos características: 1) El tipo metabólico utilizado para la obtención de energía (oxidativo, glucolítico o mixto) y 2) El tiempo requerido para su contracción y relajación ([Goldspink, 1980](#)). De acuerdo a lo anterior, las fibras se clasificaron de la siguiente manera:

1.3.3.1. Fibras lentas oxidativas (FLO). Este tipo de fibras se caracterizan por contener un gran número de mitocondrias y por desarrollar fuerza contráctil que no decae al ser estimuladas de manera prolongada, por lo que se consideran "resistentes a la fatiga" ([Close, 1964](#); [Burke, et al. 1974](#); [Golspink, 1978](#); [Squire., 1981](#)), y además porque son capaces de realizar contracciones isotónicas repetitivas en forma muy eficiente. Sin embargo, las FLO solo son capaces de desarrollar entre el 1 y el 10% de la fuerza que producen las fibras rápidas durante una sacudida simple ([Philippi y Sillau, 1994](#)).

1.3.3.2. Fibras rápidas glucolíticas (FRG). Este tipo de fibras son reclutadas cuando un músculo requiere producir movimientos rápidos, o cuando se requiere mucha fuerza. Se caracterizan porque se fatigan rápidamente cuando se estimulan de manera prolongada y presentan altas concentraciones intracelulares de miosina-ATPasa (mATPasa) y de fosforilasas ([Kandel, 1997](#)).

1.3.3.3. Fibras con metabolismo mixto (rápidas-oxidativas-glucolíticas (FCMM)).

Este grupo de fibras es un subtipo de fibras rápidas que presentan características contráctiles intermedias entre las fibras rápidas FRG y las FLO. Son resistentes a la fatiga y poseen un metabolismo combinado, oxidativo y glucolítico ([Burke, et al. 1974](#); [Goldspink, 1980](#)).

Como se expone en la Tabla 2, los distintos tipos de fibras musculares presentan un diámetro diferente entre ellas. Esto es, las fibras FLO, FCMM y FRG presentan diámetros pequeños, intermedio y grande, respectivamente. En algunos estudios, se ha

sugerido que el diámetro de las fibras está estrechamente relacionado con la demanda metabólica de oxígeno (O_2). De esa manera se explica que las fibras (FLO), las cuales tienen altos requerimientos metabólicos de oxígeno, tienden a ser de menor diámetro, lo cual reduce las limitaciones físicas para la difusión de ese gas. Mientras que las (FRG), no dependientes del metabolismo oxidativo, tienden a desarrollar mayor diámetro debido a que la difusión del oxígeno no es una limitante (Maltin, 2008).

Estos tres tipos de fibras se encuentran presentes en proporciones variables en todos los músculos, dependiendo de la función del músculo, del estadio de desarrollo, del estado patológico, entre otros factores (Huerta, et al. 1986).

1.3.4. Clasificación histoquímica de las fibras musculares

A pesar de la importancia de la clasificación sustentada en el tipo de metabolismo de las fibras, no fue sino hasta mediados del siglo XX cuando se logró clasificar a las fibras musculares de acuerdo a la actividad enzimática de la proteína más importante de la maquinaria contráctil, la miosina. Fue entonces cuando los métodos histoquímicos fundamentados en la actividad de la enzima de la cabeza de miosina llamada ATPasa miofibrilar (mATPasa) se convirtieron en los métodos de tinción mayormente utilizados para estudiar la estructura de los músculos esqueléticos. Tales métodos histoquímicos fueron desarrollados inicialmente por Padykula y Herman en 1955 y posteriormente en 1970 por Brooke y Kaiser y Guth y Samaha. Estos métodos permitieron por primera vez diferenciar los tipos y subtipos de fibras de los músculos con base a la sensibilidad diferencial de la enzima mATPasa al pH (ácido o alcalino) de los medios de pre-incubación. Esa característica permitió clasificar a las fibras de los músculos de acuerdo con el tipo de cadena pesada de miosina (MHC) que presentaban, además de la existencia de tres tipos básicos de fibras; un tipo de fibra lenta (denominadas " β " en la clasificación de Guth y Samaha y Tipo I en la clasificación de Brooke y Kaiser) y dos tipos de fibras rápidas (" α " y " $\alpha\beta$ " en la de Guth y Samaha, y tipos IIA y IIB en la de Brooke y Kaiser) estos tres tipos de fibras se consideraron equivalentes durante un tiempo, pero a partir de los años 80s surgió evidencia de que ello no era estrictamente cierto (Green, et al. 1982). Posteriormente, la clasificación de Guth y Samaha empezó a caer en desuso, mientras que la clasificación propuesta por Brooke y Kaiser se mantuvo vigente, convirtiéndose en la clasificación más utilizada en la literatura actual para distinguir o diferenciar los tipos de fibras de los músculos

esqueléticos (Lind y Kernell, 1991; Sjogaard, et al. 1978; Floeter, 1999). Cabe mencionar que la clasificación de Brooke y Kaiser propone la existencia de un cuarto tipo de fibra, de tipo transicional, denominado "IIC" (Sjogaard, et al. 1978; Green, et al. 1982; Harrison, et al. 1996), el cual corresponde a las fibras del tipo "IID" reportada por Shiaffino y Regianni en 1996. Así, la técnica de tinción original desarrollada por Brooke y Kaiser (1970) dio origen a una serie de técnicas modificadas, las cuales han sido utilizadas extensamente, como la técnica de Lind y Kernell 1991, utilizada en el presente estudio)

Sin embargo, a pesar de que los métodos histoquímicos de tinción (relativamente cualitativos) son limitados para la identificación de la multitud de fibras "híbridas" (que poseen varias isoformas de MHC) que han sido descubiertas en épocas más recientes mediante métodos inmuno-histoquímicos o microquímicos (electroforesis de fibra única, RT-PCR, microarreglos), las técnicas clásicas de histoquímica como la de la ATPasa miofibrilar continúan siendo útiles por su simpleza y bajo costo (Pette, 2006).

1.4. Desarrollo embrionario del sistema muscular

La mayoría de los músculos esqueléticos en los mamíferos se derivan de células del mesodermo paraxial, con excepción de algunos músculos de la cabeza que se forman a partir de células del mesodermo precordial (Buckingham, 1994). Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de los mamíferos se establecen en cada una de las somitas, dos linajes de células que en etapas posteriores darán origen a un grupo de células mono-nucleadas llamadas mioblastos. A partir del linaje de células que se establecen en la región dorso medial de las somitas, se originarán los músculos paraxiales y a partir de otro linaje de células (establecidas en la región ventromedial de las somitas), se producirán olas sucesivas de migración, dirigidas hacia algunos sitios específicos del embrión, en donde los mioblastos se diferenciarán y en etapas posteriores del desarrollo originarán los primordios musculares de los miembros pélvicos y torácicos (Ordhal y Le-Duarin, 1992).

De manera general, cuando una línea de mioblastos se fusiona para formar una fibra muscular muchos mioblastos permanecen latentes, recibiendo el nombre de células satélites (Winick y Noble, 1966; Christ y Brand-Saberi. 2002). Estas células son muy importantes en el desarrollo y mantenimiento de las fibras musculares, ya que en algunas condiciones (cuando están en etapa de proliferación) pueden asociarse con las

fibras musculares y contribuir a incrementar el número de núcleos de la fibra, y en otros casos, las células satélites permanecen como células pluripotenciales entre la membrana basal y la membrana celular de la fibra, manteniendo su capacidad de proliferación y fusión para eventualmente formar nuevas fibras musculares cuando ello fuese requerido (Schiaffino y Reaggiani, 1996).

A partir de evidencia experimental, se ha establecido que los músculos esqueléticos de los mamíferos presentan un desarrollo bifásico (Wilson, et al. 1988). Esto es, durante la primera fase del desarrollo cuando los mioblastos se encuentran ya establecidos en sus sitios de diferenciación, entran en una etapa de proliferación para después fusionarse entre sí conformando un sincicio multinucleado que da origen a células alargadas, multinucleadas, llamadas miotubos primarios (fibras musculares inmaduras), las cuales aparecen entre los 14 y 16 días de la gestación en la rata (Maltin, 2008; Rubinstein y Kelly, 1981). Posteriormente, la parte medial de los miotubos primarios recién formados da origen a otras estructuras tubulares llamadas miotubos secundarios (que proporcionan el volumen principal del músculo), los cuales crecen en forma longitudinal y rodean a los miotubos primarios que les dieron origen hasta alcanzar y eventualmente conectarse con los tendones (Wilson, et al. 1988).

Es importante mencionar que los miotubos primarios de la primera generación son los que definen la forma, el origen e inserciones de los músculos y en general este tipo de miotubos forman fibras musculares lentas (Tipo I), mientras que los mioblastos de migraciones subsecuentes (miotubos secundarios) en general a formar fibras musculares rápidas (Tipo IIA y IIB) (Vanswearingen y Lance-Jones, 1995; Maltin, 2008). Este proceso se ilustra esquemáticamente en la figura 2.

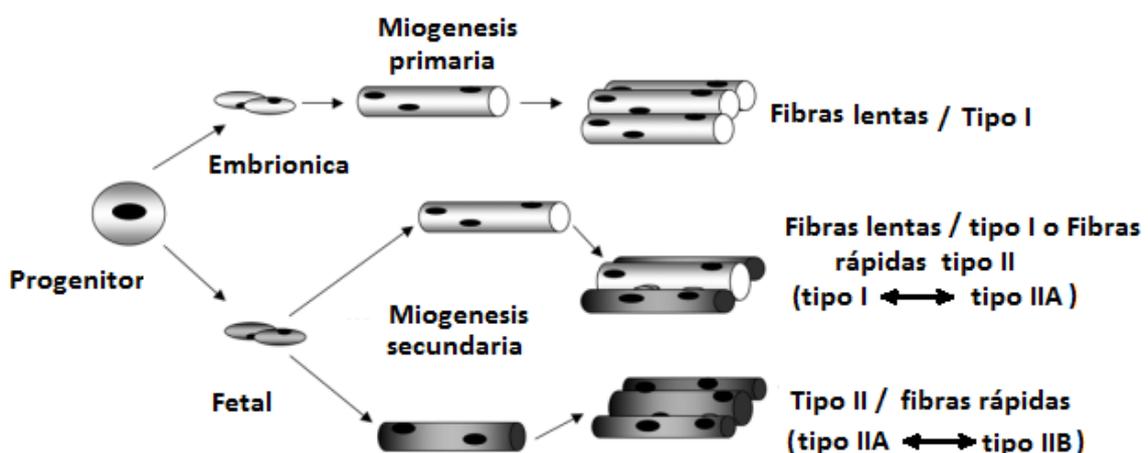


Figura 2.- Diagrama que ilustra la miogénesis primaria y secundaria incluida la formación de los tipos de fibras lentas y rápidas (Maltin, 2008).

Diversos autores han mostrado que el número de fibras de los músculos de los mamíferos no se incrementa después de que la diferenciación embriológica de los tejidos ha terminado (Ruiz, et al, 2013). Otros autores han señalado que aunado al incremento de diámetro que manifiestan las fibras musculares durante el crecimiento posnatal (hipertrofia), también se produce un incremento en la longitud de las mismas. Algunos autores, sugieren que el crecimiento longitudinal de las fibras resulta de la adición de nuevos sarcómeros en las miofibrillas, a lo largo de algunos puntos de su longitud, mientras que otros afirman que el incremento en la longitud de la fibra se produce por la agregación en serie de sarcómeros en la parte final de las miofibrillas (Goldspink, 1980; Stickland, et al. 1975).

El desarrollo del músculo esquelético de la rata se caracteriza por la diferenciación embriológica y neonatal de generaciones sucesivas de fibras musculares (Figura 3). Tal proceso de diferenciación se representa por diversos patrones de expresión de las isoformas de las cadenas pesadas de miosina (MHC), las que al parecer determinan las características fisiológicas y bioquímicas de los músculos esqueléticos. Por ejemplo, los músculos de las extremidades pélvicas de la rata en el estadio embrionario, fetal y perinatal temprano están conformados básicamente por fibras lentas, con un patrón de isoformas de las cadenas pesadas de miosina del Tipo MHC- β /lenta-emb y MHC- β /lenta-neo. Sin embargo, durante la tercera y cuarta semana de vida posnatal ocurre el proceso de transformación de las isoformas embrionarias y neonatales a las isoformas β /lenta, típicas de la primera generación de miofibras. De igual manera, las fibras de la segunda generación, derivadas de las formas embrionarias neonatales, se transforman gradualmente en las isoformas MHC- β /lenta, IIA, IIX y IIB (De-Nardi, et al. 1993; Schiaffino y Reggiani, 1996). Cabe mencionar que las isoformas ya diferenciadas, tienen la capacidad de reconvertirse a otras isoformas en etapas posnatales posteriores, en respuesta a estímulos externos (por ejemplo, por efecto de alguna lesión muscular, actividad/inactividad, Pette, 2006; Stevens, et al. 2006).

El desarrollo normal de un músculo puede ser afectado por diversos factores, tales como el ejercicio, la denervación (Redenbach y Bressler, 1988; Harris, et al. 1989) o por alteraciones hormonales como el hipotiroidismo (Wilson, et al. 1988). La desnutrición es otro factor capaz de alterar el desarrollo de los músculos esqueléticos.

Por ejemplo, se ha reportado que el número de miotubos secundarios que originan la mayoría de las fibras rápidas (Tipo II) se ve significativamente reducido de manera irreversible por la desnutrición (Wilson, et al. 1988), mientras que el número de miotubos primarios que originan a las fibras lentas (Tipo I) permanece sin cambio ante tal condición nutricional. Por esta razón, es de esperar que los músculos lentos no sean afectados de forma significativa por la desnutrición, a diferencia de los músculos rápidos, constituidos por fibras del Tipo II, originadas tanto de miotubos primarios como de secundarios (Prakash, et al. 1993).

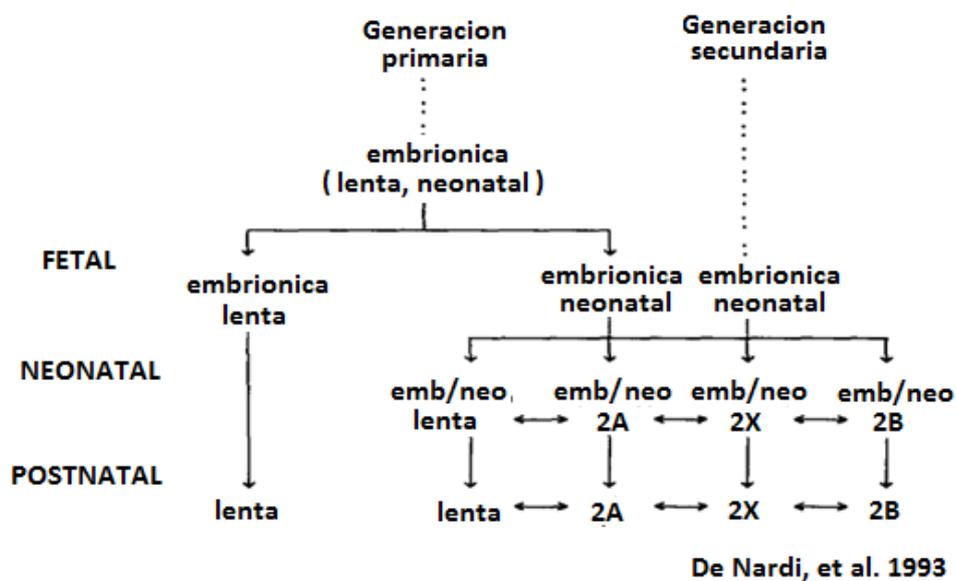


Figura 3.- Diagrama que ilustra el proceso de diferenciación de las fibras musculares durante el desarrollo embrionario y perinatal en el músculo rápido EDL de la rata Wistar (De-Nardi, et al. 1993).

El crecimiento de los músculos esqueléticos ocurre a través de dos procesos acoplados entre sí. El primero llamado hiperplasia, resulta de un incremento en el número de fibras preexistentes. El segundo y posterior, llamado hipertrofia, ocurre por un aumento en el tamaño de las fibras musculares. La hiperplasia ocurre durante el estadio de células precursoras mononucleadas (mioblastos) mientras que la hipertrofia se produce durante el estadio de célula multinucleada (Brameld, et al. 1998). En adición, las fibras musculares pueden incrementar su número cuando alcanzan un volumen y tamaño crítico, entonces comienzan a dividirse en forma longitudinal, lo que

permite que sean añadidos nuevos sarcómeros a lo largo de las miofibrillas, ocasionando un aumento en la masa miofibrilar del músculo (Goldspink, 1977).

1.5. La contracción muscular

La contracción de los músculos esqueléticos, usualmente voluntaria, se encuentra bajo control del sistema nervioso a través de la interacción entre el axón de una neurona motora y varias fibras musculares que forman la llamada unidad motora (Boron y Boulpaep, 2009). En los mamíferos, las vías nerviosas motoras se originan a partir de las motoneuronas del asta ventral de la médula espinal, representadas por las motoneuronas "γ" asociadas al huso muscular y las motoneuronas "α", que inervan a las fibras extrafusales. La inervación sensorial proviene de las fibras intrafusales (dentro de los husos musculares), las cuales registran los cambios de longitud y de los órganos de Golgi localizados en el tendón, los cuales perciben la fuerza o tensión desarrollada por los músculos durante la contracción (Aidley, 1978; Keynes y Aidley, 1985; Aidley, 1989).

La contracción del músculo esquelético se produce mediante una serie de eventos, los que en forma colectiva se les denomina acoplamiento excitación-contracción. Este proceso se inicia con la conducción del potencial de acción a lo largo del axón de la neurona motora hasta alcanzar las terminales axónicas, causando la liberación del neurotransmisor acetilcolina (Ach) de la unión neuromuscular, posteriormente la interacción del neurotransmisor con sus receptores (nicotínicos) en la membrana de la fibra muscular, provoca un incremento en la conductancia a los iones sodio y potasio, generando un potencial de placa terminal, el que a su vez si es de amplitud apropiada, provoca un potencial de acción que se propaga por toda la membrana sarcolemal, penetrando al interior de la fibra a través de los túbulos transversos. Cada túbulo se encuentra rodeado por dos estructuras del retículo sarcoplásmico (RS) en forma de saco llamadas cisternas terminales, formando una estructura de tres piezas llamada triada (Figura 4) la cual es considerada una región subcelular crítica, en donde la despolarización de la membrana tubular se transforma en una liberación masiva de Ca^{2+} del RS, que eleva la concentración intracelular de tal catión, hasta alcanzar valores de entre 10^{-7} a 10^{-5} M (Perry y Dhoot, 1980).

1.5.1. El papel del calcio en la contracción muscular

Dos complejos proteínicos en la triada (figura 4) son de particular importancia en el proceso de acoplamiento excitación-contracción: el canal Tipo L, sensible a Ca^{2+} , localizado en la membrana del túbulo T, también denominado receptor de dihidropiridina (DHPR), y el canal de liberación de Ca^{2+} que se localiza en la membrana del RS, llamado receptor RyR. Después de la despolarización de la membrana del Tubulo Transverso (TT), el DHPR sufre un cambio conformacional y comienza a actuar como un sensor de voltaje. Cuando se activa el DHPR sufre una interacción mecánica con el receptor de RyR, lo que provoca la liberación de Ca^{2+} de la cisterna terminal.

El incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, permite su unión a la troponina "C", formándose el complejo Ca^{2+} -troponina C, el cual es capaz de provocar un cambio conformacional en el complejo de proteínas contráctiles troponina-tropomiosina que determina su corrimiento, liberando el bloqueo del sitio activo y permitiendo la interacción de la miosina con la actina, de modo que quedan expuestos 7 sitios de receptores por cada molécula de troponina "C" unida a un ión Ca^{2+} (Ganong, 1994). En tales sitios se fijan las cabezas de miosina y se forman puentes cruzados o transversos (Franzzini-Armstrong, 1970; Huerta, et al. 1986; Kandel, 1997), los que capacitan al sarcómero para producir fuerza al acortarse las fibras del músculo. La ocurrencia de cambios en alguno o en varios de estos eventos podría conducir a alteraciones en el proceso del acoplamiento excitación-contracción, los que se reflejarían en la producción de fuerza de las fibras musculares (Danieli-Betto, et al. 1995). Aunado a lo anterior, se ha demostrado que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produce un aumento en la velocidad con que se forman los puentes cruzados durante la contracción (Mattiuzzi, 2000).

En el músculo esquelético, el receptor de DHPR es un complejo proteico heteromérico, formado por 5 subunidades: $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ , δ (Figura 5). La subunidad " $\alpha 1$ " funciona como canal de Ca^{2+} sensible al voltaje (Schiaffino y Reggiani, 2011), mientras que las otras subunidades realizan una función moduladora.

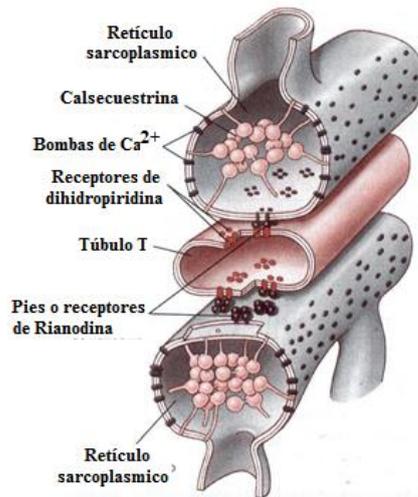


Figura 4.- Diagrama que muestra los elementos de una triada (un túbulo T y dos cisternas terminales) y su relación estructural con los receptores de Rianodina (**RyR**) y Dihidropiridina (**DHPR**) (Randall, et al. 2002).

La subunidad " $\alpha 1$ " contiene 4 dominios internos (I, II, III, IV), con 6 segmentos transmembranales (S1- S6) y contiene cargas positivas localizadas primariamente en los aminoácidos arginina y lisina, las cuales son capaces de moverse a la periferia de la bicapa lipídica en respuesta a cambios en el potencial de membrana. Tal cambio o movimiento de cargas permite al receptor de DHPR percibir la despolarización de la membrana y provocar un cambio conformacional en dicha proteína, lo que induce al receptor de RyR a sufrir un cambio en su conformación, permitiendo la apertura de los canales de Ca^{2+} (Paine y Delboro, 2006). Una proteína que comúnmente interactúa con la DHPR es la proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila las subunidades " $\alpha 1$ " y " β " de la DHPR. La fosforilación del DHPR por la PKA incrementa por lo general la actividad del canal de Ca^{2+} de manera muy rápida, durante despolarizaciones repetidas (trenes de pulsos). La rapidez de la fosforilación y el incremento subsecuente de la actividad del canal de Ca^{2+} son debidos a que la PKA se ancla en la membrana muy cerca de la DHPR, lo cual permite mejorar la salida de Ca^{2+} del RS.

Los receptores RyR se encuentran en la membrana del RS, son complejos proteicos homotetrámicos que funcionan como canales intracelulares de Ca^{2+} (Rubtsov, 2001; Schiaffino y Reggiani, 2011). El músculo esquelético y cardiaco expresan distintos tipos de receptores RyR: El tipo RyR₁ es el receptor característico del músculo esquelético y el RyR₂ lo es para el músculo cardiaco. Un tercer subtipo de

receptor, denominado RyR₃ puede expresarse en el músculo esquelético durante el desarrollo, además en otros tejidos. (Payne y Delboro, 2006). El RyR es una proteína de >500 KDa, cuyas subunidades están localizadas predominantemente en el lado citoplásmico de la membrana del RS (aproximadamente el 90% de las subunidades). Tal dominio citoplasmático constituye la región electro-densa denominada "pie" por Franzini-Armstrong en 1970.

La actividad del RyR es regulada por muchos componentes celulares, en los que se incluyen Ca²⁺, Mg²⁺ y ATP. El Ca²⁺ ejerce un efecto bifásico sobre la activación del receptor RyR₁, a bajas concentraciones lo activa (micromolares) y en altas concentraciones lo inhibe (milimolares). El Mg²⁺ a niveles fisiológicos inhibe la función del RyR₁, mientras que el ATP actúa como un activador del RyR₁, pero solo en su forma libre (Rubtsov, 200).

El RyR₁ también interactúa con otras proteínas como la Calmodulina (CaM), la cual ejerce un efecto de activación a bajas concentraciones de Ca²⁺ o de inhibición a altas concentraciones de dicho catión (Berchtold, Brinkmeier, Muntener, 2000). Otras proteínas que también se asocian con el RyR₁ son la FK506, FKBP-12 y la Calsecuestrina (CSQ). Siendo esta última, la principal proteína de amortiguamiento dentro del lumen del RS. Cada molécula de CSQ es capaz de unirse de manera reversible a 40-50 iones Ca²⁺ (Paine y Delboro, 2006), además la CSQ y otras proteínas intrínsecas de la membrana como la Triadina y la Juntina forman un complejo cuaternario (puente de proteína) con el canal de RyR₁, donde la CSQ ayuda a acumular grandes cantidades de Ca²⁺ en el lado luminal del canal (Schiaffino y Reggiani, 2011).

La cantidad de Ca²⁺ liberada del RS por un potencial de acción es mayor en las fibras rápidas que en las lentas: 350 μmol/l de Ca²⁺ en fibras rápidas, mientras que es solo de 120 μmol/l en fibras lentas de los músculos de ratón (Schiaffino y Reggiani, 2011). Tal diferencia en la concentración de calcio liberado del RS podría estar relacionada con la abundancia de canales RyR, siendo más del doble en las fibras rápidas que en las lentas. La disminución rápida de los transitorios de Ca²⁺ es determinada por la activación de mecanismos de remoción, presentes en las membranas del RS, mitocondrias y sarcolema y por la unión del ión Ca²⁺ a moléculas que lo atrapan (Parvalbúmina, troponina C, Calmodulina). Aunque es necesario resaltar que la

Parvalbúmina solo es expresada en las fibras tipo 2B y 2X pero no en las 2A y en las Tipo I (Schiaffino y Reggiani, 2011).

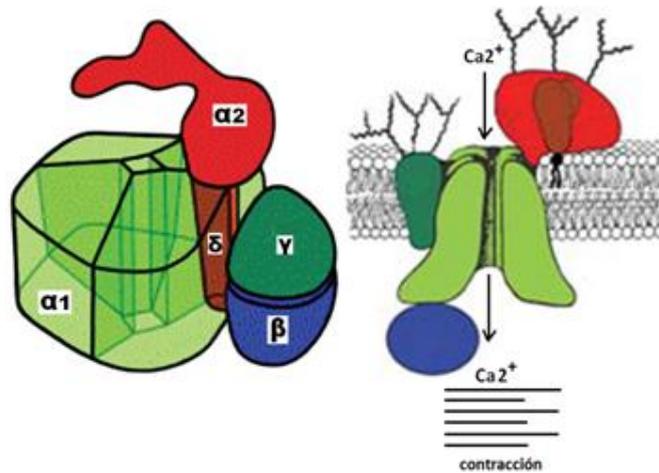


Figura 5.- Esquema que muestra la arquitectura del Receptor de hidropiridina (DHPR) y los 5 tipos de subunidades que lo conforman (Catterall, 2011).

1.5.2. Tipos de contracción muscular

Desde el punto de vista mecánico, durante el desarrollo se producen cambios en la actividad contráctil de los músculos esqueléticos. En etapas posnatales tempranas, todos los músculos de las extremidades pélvicas de la rata presentan tiempos de contracción y relajación similares (Close, 1964; Close y Rhot, 1972; Pette y Vrbova, 1985). Sin embargo, tales parámetros de la contracción se modifican después de las primeras tres o cuatro semanas de vida posnatal (Navarrete y Vrbova, 1985), tiempo en el que ocurre el proceso de diferenciación y/o maduración de una proporción de las fibras musculares. A través de ese proceso las fibras se transforman de lentas a rápidas (de tipo adulto), lo que involucra la ocurrencia de una secuencia dinámica y compleja de eventos, que comprenden cambios histológicos, bioquímicos, metabólicos, estructurales y funcionales en los músculos (Eppenberger, et al. 1964; Close, 1964; Kelly y Zaks, 1969; Morris, et al. 1976; Rubistein y Kelly, 1981; Botinelli, et al. 1991; Hall y De Luca, 1975; Morris, et al. 1976).

La respuesta de un músculo a un solo estímulo eléctrico es la sacudida simple (Figura 16) y su registro es de tipo isométrico de modo que muestra una fase de

contracción inicial (incremento de tensión) seguida de una fase de relajación (caída de la tensión), tras la cual se restablece la tensión basal (Keynes y Aidley, 1985). En etapas tempranas del desarrollo de los mamíferos, la mayoría de sus músculos esqueléticos presentan una sacudida simple débil (poca fuerza) y tiempos de contracción y relajación prolongados, correspondientes a músculos lentos y a medida que van madurando pueden generar mayor fuerza en menores tiempos de contracción y relajación (Close, 1964). Se ha sugerido que tales diferencias en la temporalidad de la sacudida simple y en la fuerza, incluyen cambios en el “estado activo de Hill” (ver más adelante) que se reflejan en la magnitud de fuerza que desarrollan los elementos contráctiles del sarcómero (Close, 1964).

La respuesta mecánica del músculo a la estimulación repetitiva se caracteriza por la suma de las sacudidas simples, es decir, si se estimula el músculo durante la fase de relajación de una respuesta contráctil, antes de que alcance la tensión basal, el músculo responde desarrollando tensión nuevamente, de modo que se produce otra respuesta antes de concluir la anterior, fusionándose las respuestas. Esto es, mientras más alta sea la frecuencia de estimulación, menor será el tiempo de separación entre las contracciones y el músculo desarrollará mayor tensión, produciendo una contracción tétrica. A frecuencias superiores a 100 Hz, el músculo desarrolla la fuerza máxima que es capaz de producir (Aidley, 1978).

Es probable que la velocidad de contracción de un músculo completo refleje en forma indirecta el número y la proporción relativa del tipo de fibras que contiene. Por ejemplo, el músculo Extensor *Digitorum Longus* (EDL) de la extremidad posterior de la rata tiene una mayor proporción de fibras del tipo II y por lo tanto se contrae y relaja rápidamente, mientras que el músculo Soleo también de la extremidad posterior es más lento para contraerse y relajarse debido a que contiene una mayor proporción de fibras tipo I (Wareham, et al. 1982).

1.5.3. Teoría del deslizamiento de los filamentos y ciclo de los puentes cruzados

Para explicar la tensión que genera un músculo durante la contracción, los investigadores Huxley, Niedergerke y Hanson, propusieron en 1954, que el acortamiento de las fibras musculares provoca el desplazamiento de los filamentos finos sobre los filamentos gruesos hacia el centro del sarcómero, por lo cual el músculo se acorta sin que la longitud de los filamentos individuales se modifique, esta propuesta se conoce como la teoría del deslizamiento de los filamentos (Huxley, 1974; Schutt y

Lindberg, 1993). El deslizamiento de los filamentos delgados se ilustra en la Figura 6. La teoría del deslizamiento de los filamentos, propone que durante el proceso de la contracción muscular los puentes cruzados (formados por las cabezas de miosina) que sobresalen transversalmente de los filamentos gruesos, se unen al filamento fino a través de un sitio activo localizado en la actina, en una posición de 90° grados, y cuando el músculo desarrolla tensión, estos puentes giran sobre su eje, a una posición de 45° grados, de modo que desarrollan tensión sobre el filamento fino, el cual se desliza sobre el filamento grueso hacia la zona media del sarcómero. Esta teoría predice que la fuerza contráctil es linealmente proporcional al número de puentes transversos que se establecen (Huerta, et al. 1986; Kandel, 1997).

Posteriormente el puente cruzado se separa del filamento fino para volver a unirse a otro punto del filamento. Los puentes cruzados de las mitades opuestas giran en dirección contraria y de esa manera, acercan a cada mitad del sarcómero hacia el centro. Un ciclo único de unión-rotación-des-unión, produce un movimiento relativo de los dos filamentos de aproximadamente 100 °A. Si todos los puentes cruzados de un músculo cumplieran un solo ciclo, el músculo se acortaría 1% de su longitud. Sin embargo, los puentes cruzados cumplen en realidad varios ciclos durante la contracción lo que explica que el músculo pueda acortarse más del 50% de su longitud en reposo (Mattiuzzi, 2000).

En términos generales, cuando una molécula de ATP se encuentra unida al sitio receptor de la cabeza de miosina, la unión de ésta con el filamento de actina se inhibe hasta que la miosina, por su actividad ATPasica, desdobla el ATP. Sin embargo, los productos del desdoblamiento del ATP no se disocian inmediatamente de la cabeza de miosina, por lo que se forma un complejo temporal intermedio de miosina, ADP y pirofosfato (Pi) y la subsecuente disociación del ADP y el Pi de la cabeza de miosina. En condiciones de reposo, cada puente cruzado mantiene unida a una molécula de ATP o los productos del desdoblamiento del ATP.

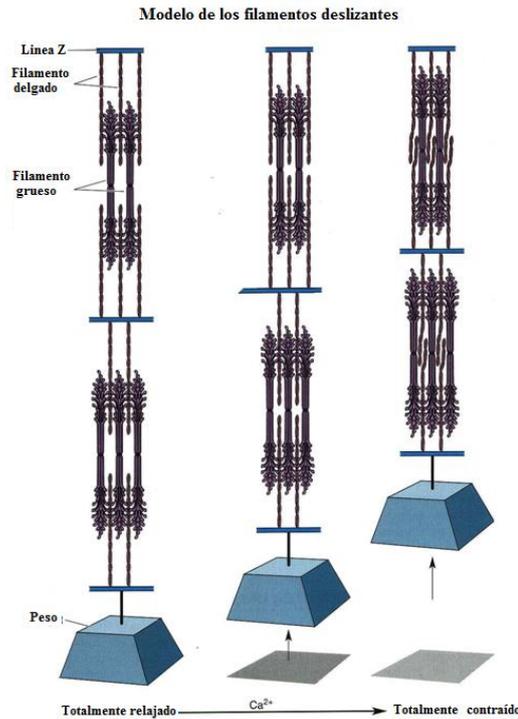


Figura 6.- Muestra el acortamiento de las fibras musculares debido al deslizamiento de los filamentos delgados hacia el centro del sarcómero (Bear, et al. 2001).

La siguiente fase de la secuencia es la unión del complejo miosina-ADP-Pi con la actina, lo que da lugar a la formación del denominado complejo activo (actina-miosina-ADP-Pi). La unión de la miosina y la actina es una unión débil ("Weak-Binding") en la que no hay producción de fuerza, pero activa a la enzima mATPasa, promoviendo así la liberación de un fosfato de alta energía del ATP. La liberación del Pi determina una unión fuerte de la miosina a la actina ("Strong-Binding") que se acompaña de un cambio en la posición del puente cruzado, provocando el deslizamiento del filamento fino sobre el grueso. De acuerdo con Boron y Boulpaep (2009), las etapas del ciclo pueden resumirse en 5 fases o pasos que en conjunto reciben el nombre de ciclo de los puentes cruzados (Veáse Figura 7).

FASES DEL CICLO DE LOS PUENTES CRUZADOS

Paso 1. La unión del ATP: El ATP se une a la cabeza de la cadena pesada de miosina (MHC), lo que disminuye la afinidad de la miosina por la actina y se produce la

liberación de la cabeza de miosina del filamento de actina (este paso no ocurre en todos los puentes cruzados, lo que evita la completa relajación del músculo).

Paso 2. La hidrólisis de la molécula de ATP sobre la cabeza de miosina da como resultado que la cabeza gire en la región de la bisagra a una posición de gatillo (ángulo de 90° respecto a los filamentos grueso y delgado), dicha rotación causa la inclinación de la cabeza, que se mueve ($\sim 11\text{nm}$) a lo largo de dos monómeros del filamento de actina.

Paso 3. Formación del puente cruzado. En este paso, la cabeza de miosina colocada en la posición de gatillo se une a una nueva posición sobre el filamento de actina, formando un puente cruzado, esta unión refleja el incremento de la afinidad del complejo miosina-ADP-Pi hacia la actina.

Paso 4. Liberación del P_i de la miosina. La disociación del P_i de la cabeza de miosina provoca un cambio conformacional en la región de la bisagra que permite que la cabeza de miosina se flexione $\sim 45^\circ$ y jale el filamento de actina $\sim 11\text{nm}$ hacia la cola de la molécula de miosina, este cambio causa que el filamento de actina sea desplazado a lo largo del filamento de miosina, generando fuerza o cambio de longitud.

Paso 5. Liberación de ADP. La disociación del ADP de la miosina completa el ciclo y el complejo actina-miosina alcanza un estado de rigidez, debido a que las cabezas de miosina permanecen en la posición de 45° , el complejo de miosina-ADP permanece unido a la actina hasta que otra molécula de ATP se una a la cabeza de miosina (Paso 1) y se inicie un nuevo ciclo.

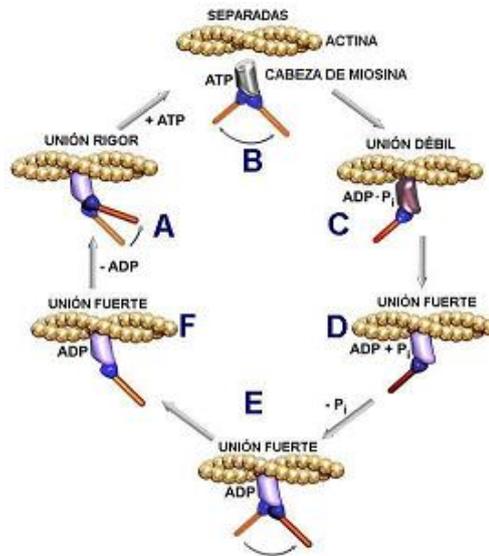


Figura 7.- Muestra esquemáticamente las fases del ciclo de los puentes cruzados en el músculo esquelético. (Geeves, et al. 2005; Fitts, 2008).

1.5.4. Modelo mecánico del músculo esquelético

Las propiedades mecánicas del músculo han sido explicadas a través del **modelo visco-elástico de Hill** (1938). Este modelo considera que el músculo esquelético se comporta de acuerdo a la ley de Hooke, donde la longitud de un objeto con una elasticidad ideal aumenta en proporción a la fuerza aplicada. De acuerdo a este modelo, el músculo esquelético está conformado por dos componentes. El primero es el elemento contráctil, que produce fuerza durante el periodo de actividad muscular, pero durante el reposo es libremente extensible y por lo tanto no ofrece resistencia alguna al estiramiento. Estructuralmente, el elemento contráctil está constituido por las proteínas contráctiles que conforman los filamentos finos y gruesos de los músculos. Este componente se estudia mediante la cuantificación de parámetros como la tensión o fuerza desarrollada durante la sacudida simple y/o tetánica y de otros parámetros como el tiempo al pico, el tiempo medio de relajación y su relación con la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma.

El segundo componente del músculo en este modelo es el elemento elástico constituido en general por los tendones y el tejido conjuntivo que rodea a las fibras musculares. El elemento elástico se subdivide en dos tipos, el componente elástico en serie y el componente elástico en paralelo (Figura 8).

La parte pasiva del elemento elástico en serie es el tejido conectivo, el cual se encuentra externo al músculo y reside en las estructuras tendinosas que unen a las fibras del músculo con las articulaciones. También se podrían incluir como elementos elásticos en serie a los discos "Z" del sarcómero (Randall, et al. 2002). Mientras que el resto del elemento elástico en serie (la parte activa) se encuentra ubicada en las células musculares mismas, y en los elementos productores de fuerza, los puentes cruzados (Mattiuzzi, 2000; Guyton y Hall, 2000).

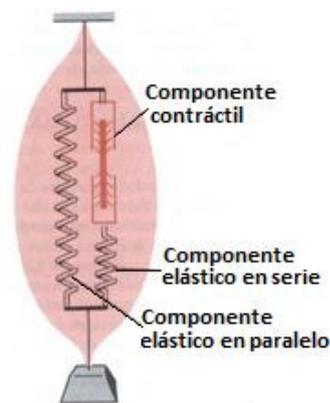


Figura 8.- Modelo de los componentes contráctil y elástico del músculo esquelético (Randall, et al. 2002).

Por otro lado, el elemento elástico en paralelo se encuentra dispuesto en forma paralela al elemento contráctil y al elemento elástico en serie (Figura 8). En el modelo visco-elástico de Hill, el elemento elástico en paralelo representa las propiedades elásticas de la membrana plasmática de las fibras musculares y del tejido conectivo que se encuentra en paralelo con las fibras. Sin embargo, es probable que otros componentes de la célula muscular, tales como los filamentos de Titina y otras proteínas como la Nebulina también influyan en las propiedades elásticas de las fibras (Aidley, 1978; Schiaffino y Reggiani, 1996).

De acuerdo con este modelo físico, para que los músculos puedan ejercer tensión sobre una articulación es imprescindible que los elementos contráctiles produzcan en primera instancia, una tensión equivalente a la fuerza necesaria para vencer la resistencia impuesta por el elemento elástico (tensión pasiva) y subsecuentemente, tengan la capacidad de ejercer tensión sobre la articulación (tensión activa). Por lo tanto,

la manifestación de la tensión muscular durante una sacudida simple depende en gran medida de las características de los dos tipos de elementos, esto es, mientras mayor sea el elemento elástico mayor tensión tendría que desarrollar el elemento contráctil (Aidley, 1978).

El componente elástico en serie debe ser estirado antes de que pueda transmitirse la tensión desarrollada por el componente contráctil, cuando la tensión desarrollada en los componentes elásticos en serie iguala el peso de la carga, el músculo comienza a acortarse desarrollando una contracción isotónica (el músculo cambia de longitud), esto es lo que produce el cambio de posición de la articulación. Ahora bien, esa acción es dinámica y puede dividirse en concéntrica y excéntrica. En la primera, cuando el músculo se acorta la articulación se mueve y se desarrolla tensión, mientras que en la segunda, la resistencia excede la fuerza que desarrolla el músculo y éste desarrolla tensión cuando se encuentra estirado (Virgen Ortiz, 2002). Por otro lado, si la carga es pesada como para que el músculo no pueda acortarse (no cambia la longitud) se tendría una contracción isométrica (Randall, et al. 2002). Estas son, en términos generales, las dos formas en que los músculos pueden contraerse. Por ello, la contracción isométrica es característica de músculos encargados de mantener la posición corporal constante, mientras que la contracción isotónica es típica de los músculos cuya función es desplazar articulaciones (Aidley, 1978).

1.5.5. Curvas de tensión-longitud y estado activo

Durante la contracción muscular, los sarcómeros se acortan debido a que los filamentos de actina se deslizan hacia el centro de la sarcomera jalados por los puentes cruzados (o transversos) y como los filamentos delgados están anclados en los discos Z, los sarcómeros se acortan. Una de las pruebas que apoya la teoría de los filamentos deslizantes es la relación longitud vs tensión. La curva longitud-tensión relaciona el grado de superposición de los filamentos gruesos y delgados y la tensión desarrollada. Los puentes cruzados del filamento grueso se activan y se adhieren a los filamentos delgados de actina antes de que estos inicien el deslizamiento de uno sobre el otro. Más aún, antes del deslizamiento de los filamentos éstos deben compensar la laxitud de los componentes elásticos en serie antes de desarrollar completamente la tensión. El estado de los puentes cruzados puede determinarse por medio de la aplicación de tirones rápidos después de la activación (pero deben ser aplicados antes de que el músculo haya desarrollado por completo su tensión Randall, et al. 2002). La razón para la aplicación

de los tirones rápidos es provocar la extensión de los componentes elásticos en serie, eliminando el tiempo que se requiere para que el elemento contráctil los estire. La tensión registrada representa entonces la fuerza de las uniones entre los filamentos gruesos y delgados, la cual se relaciona con la fuerza de adhesión de los puentes cruzados en el momento del tirón rápido, si la fuerza durante el tirón rápido es mayor a la fuerza de adhesión de los puentes cruzados, estos se separan del filamento delgado. Siendo tal fuerza igual a la capacidad de carga del músculo en el momento del estiramiento y será proporcional al promedio del número de puentes cruzados activos del sarcómero. Por lo tanto, el término estado activo es referido a la tensión del músculo medida durante experimentos de estiramiento rápido, después de una breve estimulación y corresponde a la adhesión de los puentes cruzados de miosina a los filamentos delgados de actina y al pequeño acortamiento interno que se produce (Randall, et al. 2002). Se considera que esta secuencia temporal ocurre en paralelo a los cambios en la concentración de Ca^{2+} sarcoplásmico libre. La prolongación del estado activo por un tren de potenciales de acción de alta frecuencia se denomina tetanía. La producción de fuerza por el aparato contráctil resulta de la interacción de los puentes cruzados de miosina-actina. De manera simplificada, la regulación de la fuerza a nivel de los puentes cruzados puede ser descrita como un modelo de dos estados. El cual incluye: a) Grupos de puentes con unión débil (“Weak-Binding”; WB) o estados donde no se genera fuerza y b) Grupos de puentes en unión fuerte (“Strong-Binding”; SB) o estados de producción de fuerza. Cuando el Ca^{2+} libre se incrementa arriba de un nivel umbral, los puentes cruzados ciclan continuamente entre esos estados. La transición entre los dos estados se caracteriza por un índice o proporción constante de transición del estado WB al SB (f_{app}) y del SB al WB (g_{app}). La fracción de puentes cruzados en estado SB (F_s) pueden ser definidos como: $F_s = (f_{app}) / (f_{app}) + (g_{app})$ (Ward, et al. 2004).

1.5.6. Factores que pueden afectar la respuesta contráctil de los músculos

El músculo esquelético sufre cambios profundos en la composición de sus sistemas contráctiles, regulatorios y de producción de energía durante el crecimiento, particularmente poco antes del nacimiento y durante la vida posnatal temprana (Goldspink y Ward, 1979). Por ejemplo, ocurren cambios en el curso temporal del estado activo (Close, 1964), en las características de los elementos elásticos, en la actividad enzimática (de la mATPasa), en los patrones de inervación (de polineural a mononeural), además de la diferenciación y maduración del sistema de túbulos

transversos y membranas del retículo sarcoplásmico (RS). [Goldspink y Ward, 1979](#); [Pereon, et al. 1993](#); [Takekura et al. 1994](#)) y otros factores que regulan la concentración del $[Ca^{2+}]_i$ ([Pette y Staron, 1990](#)).

Gran número de factores internos y externos, son capaces de modificar la respuesta contráctil de los músculos esqueléticos, algunos de ellos se muestran en la tabla 3.

FACTORES QUE MODIFICAN LA MAGNITUD DE FUERZA QUE PRODUCEN LOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS

- 1.- El número de fibras que contienen ([Bedi, et al. 1982](#)).
- 2.- Las proporciones de tipos de fibras que presentan ([Toscano, et al. 2008](#)).
- 3.- El pH sarcoplásmico, [lactato], $[HCO_3^-]$, ([Hansen, et al. 2005](#); [Cristensen, et al. 2005](#)).
- 4.- El Status hormonal, (hormonas tiroideas TSH, T3, T4 ([Everts, 1996](#); [Harrison, et al. 1996](#)).
- 5.- La concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) ([Power, et al. 2008](#); [Oba, et al. 1996](#)).
- 6.- La rigidez y/o elasticidad de los componentes elásticos ([Toscano, et al. 2008](#))
- 7.- Ángulo de pinnación y longitud de la fibra ([Narici y Maganaris, 2006](#); [Biewener, 2003](#)).
- 8.- Temperatura ([Broch-Lips, et al. 2007](#); [Ranatunga, Wilye, 1983](#), [Ranatunga, 1982](#))
- 9.- Fracción de puentes cruzados en estado de unión fuerte "Strong-Binding" SB. ([Ward, et al. 2004](#)).
- 10.- Desnutrición ([Wareham, et al. 1982](#); [Ramírez Oseguera, et al. 2013](#)).
- 11.- Cantidad de proteína contráctil ([Moran, et al. 2006](#)).
- 12.- Proporción de fibras híbridas ([Peuker y Pette, 1997](#); [Stephenson, 2001](#)).

Tabla 3.- Se muestran algunos factores intrínsecos y extrínsecos que son capaces de modificar la fuerza de contracción en los músculos esqueléticos.

2. ANTECEDENTES

La desnutrición es un estado de deficiencia en el consumo de energía y/o nutrimentos o en la biodisponibilidad de ellos, provocada por diversas causas (Rodríguez, 2011).

Actualmente la caracterización de los efectos de la desnutrición sobre los procesos biológicos, órganos y tejidos de los seres vivos, es una prioridad para la investigación científica debido a la incidencia, la prevalencia y la distribución de esta patología en el mundo. (Existen más de 1000 millones de personas desnutridas, Blakburn, 2001; 178 millones de ellos, son niños menores de 5 años los cuales sufren desnutrición crónica (talla baja para la edad) ENSANUT, 2012).

La prevalencia de la desnutrición crónica en niños menores de 5 años en México es de 1.5 millones (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición ENSANUT, 2012).

En la literatura existe un cúmulo de evidencia morfológica, fisiológica, bioquímica y conductual sobre los efectos que genera la desnutrición crónica sobre diversos órganos y tejidos (Morgane, et al. 1992, 1993), en muchos de ellos destaca que el músculo esquelético es el tejido más afectado por la privación crónica de alimento en los organismos (Smart y Bedi, 1982; Brozanski, et al. 1993; Harrison, et al. 1996; Desai, et al. 1996;).

Existe una gran variedad de músculos esqueléticos en los vertebrados, su variabilidad se deriva de su localización corporal, de la función que desempeñan y de la composición de los distintos elementos musculares que los conforman (por ejemplo: la proporción de tipos de fibras) (Pette, Peuker y Staron, 1999). Tal heterogeneidad (ningún músculo es igual a otro), ya sea en forma o función, plantea un reto para la comprensión de las propiedades funcionales de los músculos. Por lo anterior, la investigación sobre la expresión fenotípica de los músculos esqueléticos completos o de fibras musculares aisladas, durante el desarrollo, la vida adulta y la vejez y/o bajo condiciones patológicas (desnutrición) o de normalidad resulta ser de gran relevancia biológica (Pette y Staron, 1990; Cornachione, et al. 2011).

Durante períodos de estrés nutricional prolongados, el músculo esquelético es uno de los tejidos más vulnerables debido a la poca prioridad que le da el organismo en la repartición de nutrientes, comparado con otros órganos del cuerpo (páncreas, cerebro, corazón), y su vulnerabilidad se incrementa cuando este fenómeno ocurre durante el

estadio prenatal y/o posnatal temprano (Zhu, et al. 2006). Sin embargo, aún no se conoce cuál es el o los mecanismo (s) específico(s) involucrado(s), ni cuáles son los efectos estructurales o funcionales que se provocan en el tejido muscular, ello posiblemente debido al reducido número de estudios

En la literatura se encuentra evidencia experimental reciente (Brameld, 2004; Zambrano, et al. 2006) que indican que el fenotipo de las fibras musculares juega un papel importante en la génesis y desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas en la vida adulta de varias especies animales. Por ejemplo, los resultados de diversos estudios donde se han aplicado diferentes protocolos de ingesta de nutrientes, durante el desarrollo pre- y posnatal, indican que los cambios observados en las proporciones de los tipos de fibras musculares causados por estrés nutricional se relacionan con alteraciones metabólicas no solo en los músculos sino en toda la economía de los animales afectados. Por ejemplo, el incremento en la proporción de fibras del Tipo IIB y el decremento de fibras IIA en los músculos esqueléticos, ha sido relacionado positivamente con obesidad, resistencia a la insulina, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Cabe mencionar que, las crías de las ratas (Wistar) sometidas a tales condiciones nutricionales presentan una predisposición transgeneracional (hasta 12 generaciones) a padecer tales alteraciones metabólicas (Zambrano, et al. 2005).

Otros investigadores, han reportado que la presencia de estrés nutricional en el estadio perinatal en humanos, ratas y ovejas es capaz de provocar cambios en las proporciones de los tipos de fibras de los músculos esqueléticos. Se ha establecido una relación positiva entre resistencia a la insulina y bajas proporciones de fibras Tipo I y IIA (Harding, 2001). Asimismo, se ha determinado en humanos y ratas una relación positiva entre el aumento de fibras IIB y obesidad exógena, la cual ocurre concomitantemente con una reducción de la actividad de la carnitin-palmitoil-transferasa (enzima clave en la oxidación de los ácidos grasos, Brameld, 2004; Maltin, 2008). Observaciones como las anteriores han llevado a algunos investigadores a plantear la posible existencia de un fenotipo obesogénico de origen prenatal provocado por la desnutrición (probablemente relacionado con el "fenotipo ahorrador" de la hipótesis de Baker).

Por otro lado, es importante destacar que en la actualidad el número de estudios en donde se evalúan los efectos de la desnutrición crónica sobre las propiedades funcionales de los músculos esqueléticos es relativamente escaso (Krishnamurthy, et al. 1992; Prezant, et al. 1994; Bissonnette y Jeejeebhoy) y que en la mayoría de tales

estudios, se han empleado animales macho adultos, a pesar de que el mayor efecto de la restricción de nutrientes (aguda o crónica) ocurre durante el desarrollo pre y posnatal de los organismos ([Wareham, et al. 1982](#); [Prakash, et al. 1993](#)). Los resultados obtenidos en los estudios mencionados indican que los músculos esqueléticos de animales desnutridos presentan una pérdida notoria de peso y volumen corporal, así como algunas alteraciones en la respuesta contráctil (por ejemplo, incremento en el tiempo de contracción y en la resistencia a la fatiga; [Prezant, et al. 1994](#)). Sin embargo, como se mencionó previamente, resulta notable que no existan estudios que analicen las alteraciones provocadas por una desnutrición crónica sobre las características estructurales y funcionales de músculos esqueléticos de ambos géneros, machos y hembras, durante las diversas etapas del desarrollo posnatal. También es conveniente señalar que un número importante de estudios sobre el efecto de la desnutrición en músculos han sido abordados desde los puntos de vista histológico ó bioquímico por separado de las características funcionales ([Rowe y Goldspink, 1969](#); [Ihemelandu, 1985](#); [Ward y Stickland, 1993](#); [Bissonette y Jeejeebhoy, 1998](#)).

Los músculos esqueléticos de los mamíferos machos y hembras difieren en muchos aspectos, por ejemplo: presentan distintos porcentajes de tipos de fibras, en el tipo de metabolismo energético, en la velocidad de contracción, en la resistencia a la fatiga, en la fuerza que desarrollan y en la magnitud del daño provocado por contracciones excéntricas repetidas. Los músculos de los machos son más glucolíticos, generan más fuerza, se fatigan más rápido, se recuperan más lento y además presentan más cambios histopatológicos después de contracciones excéntricas repetidas ([Glenmark, et al., 2004](#)).

También se han determinado diferencias relacionadas con el género en el metabolismo de los lípidos, por ejemplo, en el contenido intramuscular de triacilglicerol y de los niveles de la proteína translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) los cuales son mayores en hembras que en machos, además los músculos de las hembras usan más lípidos durante el ejercicio que los machos. Los factores responsables de esas diferencias de género en el metabolismo muscular aun no son conocidas ([Schiaffino y Reggiani, 2011](#)).

A pesar de la existencia de estudios donde se ha determinado que el estrés oxidativo es capaz de modificar la fuerza de los músculos esqueléticos ([Andrade, et al. 1998, 2001](#); [Tupling, et al. 2007](#); [Ramirez-Oseguera et al, 2013](#)) no se evaluado de forma definitiva los efectos del estrés oxidativo provocado por la restricción pre y

posnatal de alimento sobre las propiedades contráctiles de los músculos esqueléticos y prácticamente no existen estudios donde se evalué su posible relación con la diferenciación y maduración de los tipos de fibras durante el desarrollo en ambos géneros.

Asimismo, los niveles de transcritos de las cadenas pesadas de miosina (MHC) presentes en fibras musculares de contracción lenta (MHC-lenta) en las hembras (humanas) son más bajos, pero el nivel de transcritos de las cadenas pesadas de miosina en las fibras musculares intermedias (MHC-2A y 2X) son más altos, los mecanismos que explican o subyacen a estas diferencias no son conocidos, pero se han relacionado con el tipo de hormona sexual predominante en cada género.

Es ampliamente conocido que algunas hormonas sexuales, tales como la testosterona (el andrógeno circulante más importante), provocan un aumento de la masa y el volumen de los músculos esqueléticos "efectos androgénicos", mediante la inducción del incremento de la síntesis de proteínas, probablemente mediada por el factor de crecimiento Tipo I, ligado a la insulina "IGF-I insuline like growth factor I". Sin embargo, en términos de la composición de tipos de fibras del músculo, algunos autores concluyen que los esteroides androgénicos no juegan un papel importante en la regulación de la composición de las isoformas de las cadenas pesadas de miosina (MHC) en la mayoría de los músculos esqueléticos de la rata y tampoco parecen tener influencia en la distribución de relativa de los tipos de fibras en humanos ([d'Albis y Butler-Browne, 1993](#); [Harridge, 2006](#)). Sin embargo, en contraposición, otros autores sugieren que la testosterona si tiene una influencia profunda en la composición de los tipos de fibras de algunos músculos de ciertas especies que presentan fuerte dimorfismo sexual como por ejemplo: El músculo temporalis, el músculo masetero de los cerdos de Guinea y del conejo, los músculos laríngeos de los sapos y el músculo elevador del ano en la rata ([Pette y Staron, 2000](#)), incluso este último sufre una completa involución y desaparece después del nacimiento en ratas hembras a menos que al animal le sea administrada testosterona.

El músculo temporalis de los cerdos macho de Guinea, es un músculo rápido (blanco) mientras que en la hembra es un músculo lento (rojo). Sin embargo, en ambos géneros la histoquímica y el fenotipo de las proteínas contráctiles puede revertirse por la castración (en el macho) o por la administración de testosterona en la hembra ([Schiaffino y Reggiani, 2011](#)).

A pesar de que en la mayoría de los estudios no se han reportado diferencias de género en los músculos esqueléticos de las extremidades de las ratas, existen estudios que indican que la testosterona induce una reducción del porcentaje de fibras del Tipo I en músculos como el extensor largo de los dedos (EDL), el gastrocnemio y el soleo de ratas hembras (Isayama, et al. 2006).

Otras hormonas sexuales como los estrógenos es probable que también provoquen cambios en las funciones del músculo esquelético, si bien aún no han sido apropiadamente definidas, debido en parte a que existen pocos estudios en los que se haya evaluado el efecto de estas hormonas en músculos de los dos géneros y además porque en la literatura existen reportes contradictorios. Por ejemplo, estudios llevados a cabo en mujeres a la mitad del ciclo menstrual (fase folicular), cuando los niveles de estrógenos son altos, indican que durante esta fase se provoca un incremento en la fuerza de algunos músculos voluntarios como el extensor de la rodilla y el músculo adductor pollicis (Sarwar, et al. 1996; Phillips, et al. 1996). Sin embargo, estudios realizados en otros músculos indican que no se presentan cambios en la magnitud de la fuerza contráctil de músculos durante las fases del ciclo menstrual en donde se incrementan naturalmente los niveles de estrógenos.

Por otro lado, estudios realizados en músculos EDL de ratones silvestres (Wild-type) y en ratones que carecen del receptor beta de estrógenos (mutantes $ER\beta^{-/-}$), mostraron que la magnitud de la fuerza contráctil desarrollada durante la sacudida simple y la contracción tetánica, ~~cuya magnitud~~ no presenta diferencias significativas entre los dos grupos de ratones. En esos estudios, también se determinó que la deficiencia de receptores beta (β) de estrógenos en los ratones mutantes $ER\beta^{-/-}$ no afecta significativamente a otros parámetros de la contracción del músculo EDL, tales como: el tiempo de contracción, el tiempo medio de relajación o la relación fuerza-frecuencia. Los autores, concluyen que la deficiencia de receptores β de estrógenos ($ER\beta$) no produce cambios en las propiedades contráctiles básicas, pero sugieren la posible existencia de otro(s) factor(es) en las diferencias que subyacen entre los músculos de machos y hembras (Glenmark, et al. 2004).

Estudios realizados en fibras únicas de músculos de ratas hembra juveniles y viejas, han sugerido la existencia de un mecanismo de acción directo de los estrógenos sobre los puentes cruzados de los músculos esqueléticos. En esos estudios, se observó que la disminución de la fuerza en los músculos de las ratas con bajos niveles de estrógenos (ratas viejas) estaba asociada a un escaso porcentaje de puentes cruzados en

estado de fuerza máxima (“Binding-Strong configuration”) más que a cambios en el número de puentes cruzados (Lowe, et al. 2002).

Asimismo, otros estudios realizados en fibras de músculos de sapo en los que se utiliza la difracción de rayos X, sugieren que la disminución de la fuerza en los músculos está asociada a diferencias en el grado de inclinación axial de las cabezas de miosina, en temperaturas altas o bajas (Harridge, 2006).

La influencia de otras hormonas, diferentes a la testosterona y los estrógenos sobre los músculos esqueléticos han sido ampliamente demostrada, por ejemplo, se sabe que la desnutrición provocada por restricción severa de nutrientes en las ratas y otros mamíferos provoca la deficiencia de hormonas tiroideas (hipotiroidismo) la cual es capaz de modificar las propiedades contráctiles de los músculos esqueléticos y el fenotipo de las fibras, convirtiéndolos de músculos rápidos a lentos (Pette y Staron, 2000).

En un estudio realizado en 1982 por Wareham, y colaboradores, se reportó incremento en la fuerza normalizada (por unidad de peso húmedo) durante la sacudida simple (twitch) y en la respuesta tetánica del músculo EDL de ratas macho adultas desnutridas durante la gestación y la lactancia. Estos autores fueron los primeros en reportar un incremento de la fuerza normalizada en los músculos de animales desnutridos. Sin embargo, años después, Brozanski y colaboradores (1993) al analizar la respuesta contráctil del músculo EDL en ratas desnutridas durante la gestación y la lactancia observaron que la magnitud de la fuerza normalizada del músculo no difería de la de los músculos de los animales control. Incluso, en el mismo año, otros autores (Prakash, et al. (1993), reportaron resultados contrarios en el músculo diafragma de ratas macho desnutridas durante la gestación, el cual presentaba una disminución en la fuerza relativa producida.

Con respecto a las características histológicas de los músculos esqueléticos de animales sometidos a restricción aguda o crónica, pre y/o posnatal, de alimentos existen estudios que han publicado resultados contradictorios. Por ejemplo, Bedi, et al. 1982 y Ruiz, et al. 2013 reportan que la desnutrición provoca un incremento tanto en el porcentaje de fibras lentas (Tipo I) como de fibras intermedias (Tipo IIA), concomitantemente a este proceso se produce una disminución compensatoria del porcentaje de fibras rápidas (Tipo IIB) en el músculo EDL de ratas macho Wistar (adultas y juveniles). De manera contradictoria, otros estudios han reportado que la desnutrición durante la gestación y lactancia aumenta la proporción de fibras rápidas

(Tipo IIB) y disminuye la proporción de fibras Tipo IIA en músculos como el longissimo dorsal (Zhu, et al. 2006) y el extensor largo de los dedos (EDL) de ratas Wistar macho adultas (Daniel, et al. 2007; Toscano, et al. 2008; Maltin, 2008). Así mismo, existen estudios histoquímicos en músculos como el EDL y soleo de ratas macho adultas con restricción de alimento (40%) durante el embarazo y la lactancia que no mostraron cambios en la proporción de tipos de fibras (Howells, et al. 1979).

En un estudio previo, realizado en nuestro laboratorio (Segura, 1993) con ratas Wistar macho de cuatro edades diferentes (21, 23, 25 y 27 días de edad) sometidas a desnutrición neonatal (mediante hacinamiento de 14 crías por camada), se determinó que la respuesta mecánica provocada por estímulos únicos y/ o trenes de pulsos eléctricos aplicados directamente al músculo mixto Gastrocnemio-Soleo se produce un incremento significativo en los tiempos de contracción y de relajación durante la contracción simple, además de presentar una fusión de la respuesta contráctil ante frecuencias bajas de estímulos, con respecto a los animales control (8 crías por camada). En ese mismo estudio, se observó que la fuerza por gramo de tejido húmedo desarrollada por el músculo G-S durante la sacudida tetánica, era mayor en los animales desnutridos que en los control. De los resultados obtenidos, se concluyó que los músculos G-S de animales desnutridos presentan probablemente una mayor proporción de fibras de sacudida lenta que el de las ratas controles y que la mayor respuesta provocada durante el tétano, podría deberse a cambios en el metabolismo energético muscular. Esto último fue corroborado en el mismo estudio (Segura, 1993) al observar un incremento significativo en la actividad de la enzima Creatina-Cinasa (CK), la cual forma parte importante del metabolismo anaeróbico para la producción de ATP (Walliman, et al. 1992). Sin embargo, debido a que en ese estudio no se realizó un análisis histológico del músculo G-S no fue posible determinar el tipo de fibra muscular que fue mayormente afectada por la alimentación deficiente.

Por otro lado, Ramirez-Oseguera y colaboradores (2013) evaluaron el efecto de la desnutrición gestacional sobre el músculo EDL de ratas macho recién nacidas (día cero posnatal). Estos investigadores mostraron que la desnutrición durante la gestación induce una reducción de la masa del músculo, un decremento de la actividad de la Ca^{2+} ATPasa (SERCA) y un incremento en la fuerza de la sacudida simple (twitch) provocada en músculos EDL de ratas desnutridas, lo cual fue atribuido a un probable incremento del Ca^{2+} disponible en el mioplasma, provocado por la baja actividad de la Ca^{2+} ATPasa (SERCA). Además, en el mismo estudio se determinó la sobreexpresión

del transportador de glucosa GLUT-4 en las membranas de los túbulos transversos del músculo EDL. Sin embargo, dado que los músculos esqueléticos de las extremidades de las ratas y ratones recién nacidos se encuentran conformados básicamente por fibras lentas de tipo embrionario y neonatal, estos resultados solo aportan información sobre los efectos de la desnutrición gestacional sobre el tipo de fibras inmaduras. Por lo anterior, resulta necesario realizar otro tipo de estudios para analizar las consecuencias de la desnutrición crónica sobre el sistema muscular durante el desarrollo posnatal temprano y durante la vida del adulto, ya que el músculo esquelético sufre procesos de diferenciación y maduración importantes en las etapas posteriores al nacimiento.

Por otra parte, [Zambrano y colaboradores \(2005\)](#) han señalado que la severidad de algunas patologías metabólicas, asociadas a la desnutrición, presenta diferencias de género, siendo las ratas machos mayormente afectadas que las ratas hembras, sin que hasta el momento se haya determinado con precisión la razón de ello. Sin embargo, resulta notable que existan muy pocos estudios en los que se analicen los efectos de la desnutrición crónica sobre las características estructurales y funcionales de los músculos de hembras y los machos.

Uno de los estudios que han mostrado diferencias en el funcionamiento de los músculos esqueléticos entre ratas machos y hembras fue el realizado por [Celichowski y Drzymala \(2006\)](#). Estos investigadores estudiaron las diferencias de género en las propiedades contráctiles y la proporción de unidades motoras en el músculo gastrocnemio medial de ratas de la raza Wistar adultas. En ese estudio, los autores observaron diferencias en la proporción de las unidades motoras rápidas resistentes a la fatiga (mayor en los músculos de ratas hembras) pero no en la proporción de unidades lentas no fatigables y de unidades rápidas fatigables. Los autores sugieren que tales diferencias influyen en el incremento del tiempo de contracción, del tiempo de relajación y en el mayor desarrollo de fuerza a frecuencias bajas de estimulación de la sacudida simple (twitch) y el tétano de los músculos de ratas machos, además de presentar mayor resistencia a la fatiga en los músculos de las hembras, comparados con los machos. Como conclusión, los autores señalan que la diferencia en la proporción de unidades motoras entre los dos géneros puede atribuirse a la influencia de las hormonas sexuales, particularmente a la de la testosterona.

Otras investigaciones han evaluado la existencia de posibles diferencias entre los músculos esqueléticos de machos y hembras en su respuesta al ejercicio, en este sentido se ha demostrado que los estrógenos desarrollan una potente capacidad antioxidante, la

cual juega un papel protector en el músculo cardíaco (Kendall y Storm, 2002), aunque tal capacidad antioxidante no ha sido evaluada en la protección del músculo esquelético contra el daño inducido por ejercicio.

En estudios realizados en modelos animales y en músculos esqueléticos de mujeres, se ha mostrado que el músculo (*vastus lateralis*) presenta baja actividad de la enzima Creatina-Cinasa (CK) después del ejercicio excéntrico y/o el ejercicio prolongado en comparación con los músculos de los machos (Stupka, et al. 2000; Kendall y Storm, 2002).). Dado que la CK, es usada como un marcador indirecto de daño muscular, se ha sugerido que el músculo esquelético de las hembras sufre menos daño que el músculo de los machos durante este tipo de ejercicio. Los investigadores señalan que es probable que los resultados observados sean indicativos de un efecto estabilizante de las membranas de las células musculares provocado por los estrógenos (17- β estradiol), ya que tales moléculas esteroideas son capaces de inhibir diversos procesos que ocurren durante la respuesta inflamatoria asociada a los ciclos de daño y reparación de los músculos. Esta posibilidad es apoyada por los resultados de protocolos experimentales de daño por ejercicio en donde no se han reportado diferencias histológicas entre los músculos de machos y hembras (Stupka, et al. 2000; Kendall y Storm, 2002).

Sin embargo, existen estudios realizados en musculos esqueléticos de mujeres durante el climaterio en los cuales se utilizo "terapia de reemplazo hormonal" estableciéndose que los estrógenos evitan el decaimiento notorio de la fuerza (especifica) en los musculos, aunque el mecanismo para explicar este efecto es aún desconocido (Phillips, et al. 1993).

De acuerdo a la revisión de la literatura y a los antecedentes mostrados, resulta notable el señalar que prácticamente no existen estudios de índole funcional e histológico orientados al análisis de los efectos que ejerce la desnutrición crónica (pre- y posnatal) sobre las propiedades contráctiles y la proporción de tipos de fibras presentes en músculos esqueléticos de ratas, de ambos géneros, durante el desarrollo posnatal (que abarquen desde etapas tempranas hasta la etapa adulta de los individuos).

Por lo anterior, podría considerarse que hasta el momento se desconoce si la desnutrición pre- y posnatal afecta en forma diferencial las proporciones de tipos de fibras y las características contráctiles de los músculos (rápidos) de ratas hembra y macho. Y tampoco se cuenta con información sobre los efectos de la desnutrición

crónica en los músculos esqueléticos durante distintos estadios de la vida (etapas de lactancia, juvenil y adulto) en ratas macho y hembra.

3. JUSTIFICACIÓN

Dado que el músculo esquelético representa aproximadamente el 45% de la masa corporal de los organismos, la determinación de los efectos que ejerce la desnutrición crónica sobre este tejido es de gran relevancia debido a las repercusiones que pueden sufrir cualquiera de las variadas funciones que dependen de los músculos esqueléticos, (como por ejemplo: La locomoción, la ventilación pulmonar, la termogénesis, el metabolismo energético general, etc.)

Por otro lado, la interacción entre género y estrés nutricional resulta de gran interés biológico, debido a la vulnerabilidad metabólica, funcional y estructural que presentan diversos órganos y tejidos corporales (páncreas, cerebro, cerebelo) de individuos macho de diversas especies animales (ratas, ratones, ovejas, cerdos y humanos) comparado con los mismos órganos y tejidos de las hembras de la misma especie ([Smart, 1973](#); [Howells, et al. 1979](#); [Lucas, et al. 1996](#); [Desay, et al. 1996](#); [Zambrano, et al. 2006](#); [Sathishkumar, et al. 2008](#)).

La mayoría de los estudios que analizan los efectos de la desnutrición han sido realizados primariamente en animales macho y pocos en hembras ([Celichowski y Drzymala, 2006](#)) y menos aun, se han comparado entre géneros. Posiblemente, la razón de tal asimetría en cantidad de estudios se encuentre relacionada con las variaciones hormonales cíclicas que ocurren en las hembras, lo cual podrían introducir otras variables a los estudios.

De igual manera, en la literatura prácticamente no existen estudios donde se establezcan los efectos de la restricción crónica de nutrientes sobre procesos biológicos básicos como la maduración y la diferenciación de los tipos de fibras y la mecánica contráctil de los músculos esqueléticos, que abarquen desde edades posnatales tempranas del desarrollo hasta la vida adulta en ambos géneros. La carencia y/o reducida cantidad de estudios experimentales comparativos entre los dos géneros es probable que sea la causa de conclusiones que llevaron inicialmente a pensar que la desnutrición afecta de igual manera a los músculos esqueléticos de los machos y de las hembras ([Yoshioka, et al. 2007](#); [Chan y Head, 2010](#)). Sin embargo, para aceptar tales conclusiones es imprescindible contar con evidencias experimentales adecuadas que las soporten.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta el momento se desconoce si la desnutrición pre y posnatal afecta las distintas proporciones de tipos de fibras y las características contráctiles de los músculos esqueléticos (rápidos) de ratas hembras y machos, debido a la carencia de estudios en donde se compare la influencia de la restricción crónica severa de nutrientes sobre los dos géneros. Aunque, existen estudios que sugieren que los cambios en las proporciones de los tipos de fibras de los músculos esqueléticos podrían provocar cambios metabólicos que afectan toda la economía de los animales que sufren restricciones nutricionales, favoreciendo la posibilidad de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas en la vida adulta. Probablemente, la expresión de tales alteraciones estaría sujeta a diferencias de género aún no exploradas.

También es importante destacar, que la mayoría de los estudios realizados para conocer los efectos de la desnutrición crónica severa sobre la mecánica contráctil y su relación con las proporciones de los distintos tipos de fibras han sido realizados en músculos de animales macho adultos, y los resultados obtenidos en diversas ocasiones resultan ser contradictorios entre sí. Asimismo, resulta notable que no existen estudios sobre la mecánica contráctil y las proporciones de fibras en las distintas etapas del desarrollo posnatal (lactancia, estadio juvenil, adulto), a pesar de que el músculo esquelético en los dos géneros manifiesta procesos acentuados de maduración y/o diferenciación durante las primeras etapas del desarrollo, los cuales son determinantes para el desempeño adecuado de los músculos en la vida adulta. Por lo tanto, resulta de gran interés el realizar estudios experimentales en los que se determine el grado de afectación provocado por la restricción crónica severa de nutrientes sobre la función y la estructura de los músculos esqueléticos de ratas macho y hembra durante las distintas etapas del desarrollo.

El músculo EDL fue elegido para la realización del presente estudio debido a que es un músculo rápido representativo, frecuentemente utilizado en investigación (las características anatómicas del EDL se presentan en el anexo 2) debido a que la mayoría de las fibras que lo componen no solo maduran durante el desarrollo, sino que también se diferencian de fibras de sacudida lenta a fibras de sacudida rápida ([Pereon, et al. 1993](#)) y además, porque de acuerdo a la literatura, los músculos con predominancia de fibras rápidas como el EDL son más susceptibles a los efectos de la desnutrición.

5. HIPÓTESIS

La desnutrición crónica severa incrementará la proporción de los tipos de fibras rápidas y la respuesta contráctil del músculo Extensor Digitorum longus (EDL) de ratas hembras y machos de manera diferencial durante el desarrollo posnatal.

6. OBJETIVO GENERAL

El presente estudio está enfocado a evaluar de manera transversal los efectos que provoca una restricción nutricional crónica severa sobre la proporción de los distintos tipos de fibras rápidas y sobre la respuesta contráctil del músculo EDL de ratas Wistar hembras y machos, en distintos estadios del desarrollo postnatal (desde la lactancia hasta la vida adulta). Este estudio también pretende aportar información acerca de posibles diferencias de género en los efectos provocados por la desnutrición crónica severa sobre la diferenciación y/o maduración de los tipos de fibras y su repercusión sobre la función contráctil de los músculos rápidos de la rata.

6.1. Objetivos Particulares

Caracterizar las alteraciones que produce la restricción nutricional crónica severa en el músculo EDL de ratas hembra y macho con distintas edades posnatales PN10, PN20, PN30, PN40, PN60 y PN365 días de edad:

- ❖ Determinar el peso corporal y el peso del músculo EDL.
- ❖ Determinar el número total y el tipo de fibras que constituyen el músculo EDL.
- ❖ Establecer las alteraciones sobre la fuerza (normalizada por gramo de tejido húmedo) generada durante la contracción isométrica simple y el tétano del músculo EDL.
- ❖ Determinar los efectos de la desnutrición sobre el curso temporal de la sacudida simple (tiempo al pico, tiempo medio de relajación) del músculo EDL.
- ❖ Comprobar si la desnutrición crónica modifica de manera diferencial las proporciones de los distintos tipos de fibras rápidas del músculo EDL.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Animales

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones contenidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos de Norteamérica ([National Research Council, 2010](#), National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; Animal Welfare Assurance #A5036-01) y por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA. El protocolo de desnutrición de los animales fue aprobado por el Comité Institucional de Bioética para el Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio (UPEAL-Protocolo 013-02, CINVESTAV).

Dos grupos de ratas Wistar hembras (peso corporal medio: 257.4 ± 16.3 g) fueron sujetas a las siguientes condiciones de alimentación: Grupo control (C), ratas hembras adultas ($n=16$) y sus crías tuvieron libre acceso a alimento comercial (Formulab 5008, Lab diet Co. Framingham, MA, USA (composición química del alimento en la tabla 8 en el anexo 3). Grupo de ratas crónicamente desnutridas (D), ratas hembras adultas ($n=18$) fueron alimentadas con aproximadamente la mitad de la ingesta promedio de alimento consumido por los animales control, iniciando con este régimen dietético desde 2 semanas antes del apareamiento y continuando con el durante el embarazo y la lactancia ([Quiróz-González, et al. 2013](#)). Al segundo día postparto, se determinó el género (utilizando como criterio la distancia ano-genital) y el número de crías por camada (tamaño de la camada: Control 14.3 ± 1.5 crías, [media 5.5 ± 2.4 machos y 8.8 ± 2.7 hembras]; tamaño de la camada desnutridas 13.3 ± 1.1 crías, [6.6 ± 1.5 machos y 6.6 ± 2.0 hembras], ajustando a 9 crías por camada (5 machos y 4 hembras lo anterior debido a que la mortalidad en machos es mayor) y además se determinó el peso corporal de las crías (machos control: 6.4 ± 0.1 g, machos desnutridos: 6.2 ± 0.3 g; hembras control: 6.1 ± 0.3 g; hembras desnutridas: 5.7 ± 0.3 g). En el caso que ocurriese la muerte de crías al nacimiento (un individuo en una camada desnutrida) o canibalismo (dos camadas, una control y una desnutrida) las camadas fueron descartadas. Cada madre y sus crías fueron colocadas en cajas de acrílico individuales (32x47x20 cm) y el grupo de madres desnutridas continuó con la dieta al 50% del alimento consumido por el grupo de madres control hasta el destete (día posnatal 21), del destete al día de la sesión experimental las ratas crías fueron colocadas por género (5 machos o 4 hembras por caja) en cajas grandes de acrílico (43x53x20 cm) y el día de la sesión experimental (PN10, PN20, PN30, PN40, PN60, y PN365 días) las ratas macho y hembras control y

desnutridas fueron seleccionadas al azar y pesadas (PC). Los grupos de animales remanentes fueron mantenidos como reserva en caso de una falla en la cirugía o una aplicación inadecuada de la metodología experimental. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua y fueron mantenidos bajo condiciones idénticas de luz, oscuridad (ciclos (12 h – 12 h) y temperatura (22-24 °C) y no se suministraron suplementos de vitaminas, minerales y/o elementos traza al alimento de los animales desnutridos.

La ingesta de alimento consumido por las ratas madre fue determinado cada tercer día durante el periodo de gestación y lactancia.

El consumo de alimento de las ratas crías después del destete, fue estimado del alimento total consumido por los animales en cada caja, dividido por el número correspondiente de animales por caja y determinado después del destete hasta el día de la sesión experimental. Subsecuentemente, los valores de aporte energético de las ratas control y desnutridas fue calculado a partir de los datos del valor promedio de peso corporal y del consumo estimado de alimento por los animales (datos de la composición química del alimento Formulab 5008, Framingham, MA. USA proporcionados por Lab diet Co; véase tabla 8 del anexo 3).

Los requerimientos de energía de mantenimiento (maintenance energy requirements) de los animales fueron estimados de la siguiente ecuación: $112 \text{ Kcal Peso corporal PC}_{(kg)}^{0.75/\text{día}}$ (Clarke, et al. 1977; Keenan, et al. 1996; National Research Council, 1995, Tabla 4-A y 4-B) y el índice metabólico basal (the basal metabolic rate) fue determinado usando la ecuación: $H_{kcal} = 72 \text{ Peso corporal PC}_{(kg)}^{0.75}$ (National Research Council, Subcommittee of Laboratory Animal Nutrition, 1995).

El valor del combustible fisiológico del alimento (physiological fuel value), fue determinado de la suma de las fracciones decimales de proteínas, grasas y carbohidratos (como extracto libre de nitrógeno) multiplicados por 4, 9 y 4 Kcal por gramo, respectivamente.

7.2. Análisis histoenzimático del músculo

En los días PN10, PN20, PN30, PN40, PN60, y PN365, las ratas fueron anestesiadas con uretano (1.6 g/kg de peso corporal, i.p.; Komisaruk, et al. 1972) y fijadas firmemente a una tabla de disección con cubierta de corcho. El músculo EDL de la pata izquierda fue expuesto siguiendo las indicaciones anatómicas de Popesko, et al. (1992), rápidamente separado de la extremidad, pesado y sumergido en 2-metil butano,

previamente enfriado hasta el congelamiento con nitrógeno líquido (se utilizaron 9 músculos EDL de ratas hembras y 12 músculos de ratas macho por edad). La parte medial del músculo fue montada en un molde de Tissue-Tek y secciones transversales del músculo de 10- μ m de grosor fueron obtenidas (cortadas) en un micrótopo a -20 °C (Leica Microsystems, Mod. CM-1100, Nussloch, Germany). Los cortes fueron montados en portaobjetos de vidrio para su tinción mediante la técnica histoquímica de la ATPasa, utilizando cortes consecutivos. La actividad de la ATPasa miofibrilar fue expuesta en los cortes mediante una técnica modificada de ATPasa (pH 4.7), reportada por [Lind y Kernell \(1991\)](#). Brevemente: Cortes no fijados fueron pre-incubados a temperatura ambiente (21-23 °C) en buffer de acetato de sodio (100 mM) con cloruro de potasio (KCl 100 mM), con el pH ajustado a 4.7 con ácido acético (50%). Los cortes fueron procesados de la siguiente forma: a) 30-seg de lavado en un buffer de glicina (20 mM) conteniendo CaCl₂ (20mM), ajustado a pH 9.4 con NaOH (1N); b) 25-min de incubación a temperatura ambiente en un amortiguador de glicina (40 mM), conteniendo CaCl₂ (20mM) y sal disódica de ATP (2.5 mM), ajustado a pH 9.4; c) tres lavados consecutivos por 30-seg en una solución CaCl₂ (1%) seguidos por la inmersión en CaCl₂ (2%) por 3 min y tres lavados por 30-seg en agua destilada; d) 3-min de inmersión en una solución al 2% de CoCl₂ (Baker), seguido por 15 lavados en agua destilada; y e) 30-seg de inmersión en sulfuro de amonio amarillo (1%) seguido por un lavado mínimo de 30-seg en agua destilada. Los cortes fueron montados en portaobjetos embebidos en gelatina de glicerol. Se tomaron fotomicrografías de cada corte de los músculos mediante una cámara digital (Leica, Mod. DFC 320, Germany), montada en un microscopio óptico (Leica, Mod. DNLS, Germany). Con la técnica de ATPasa ácida (pH 4.7) se identificaron a las fibras oscuras, grises y claras en los cortes como Tipo I, Tipo IIB, y Tipo IIA (Figura 9), respectivamente, siguiendo la nomenclatura usada por [Brooke y Kaiser \(1970\)](#) y [Lind y Kernell \(1991\)](#).

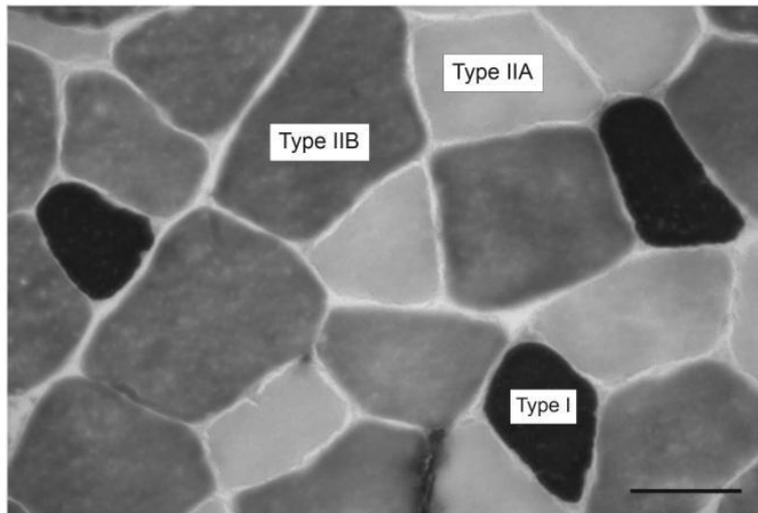


Figura 9.- Fotomicrografía representativa de un corte transversal del músculo EDL de una rata macho control de 365 días de edad, teñida mediante la técnica $mATPasa$ ácida (pH: 4.7). Las fibras fueron identificadas como Tipo I (obscuras), Tipo IIA (claras) y Tipo IIB (grises) de acuerdo con la nomenclatura de [Brooke y Kaiser \(1970\)](#). Barra de calibración = 50 μm .

Debido a que los tipos de fibras en el músculo EDL no se encuentran distribuidas homogéneamente ([Kernell, 1998](#); [Wang y Kernell, 2001](#)), el número total de cada tipo de fibras fue determinado independientemente por 3 observadores y la proporción de cada tipo de fibra fue expresado como porcentaje del número total de fibras y se determinó la proporción de fibras Tipo IIB vs Tipo IIA ($R_{IIB/IIA}$) en los músculos EDL de ratas de ambos géneros (machos y hembras) control y desnutridos. El área de sección transversal (A) de 20 fibras Tipo I y 50 fibras Tipos IIA y IIB fueron medidas de cortes de 5 diferentes músculos EDL por edad y condición alimenticia con el programa Sigma Scan Pro (Systat Software Inc.). El área transversal de las fibras fue expresada en micras cuadradas (μm^2). Subsecuentemente, se calculó el área transversal total del músculo ocupada por todas las fibras (A_T) a partir de la suma de las áreas transversales de los tipos de fibras ($A_T = A_I + A_{IIA} + A_{IIB}$) y expresada en milímetros cuadrados (mm^2) véase figura 15 y tabla 6.

7.3. Análisis de la sacudida simple y tetánica del músculo

El músculo EDL de la pierna derecha de los animales, controles y desnutridos (por cada edad se utilizaron 9 músculos de ratas hembras y 12 músculos EDL de ratas machos) fue expuesto y preparado para su estimulación y registro *in situ*, asegurándose

de mantener intacto el suplemento sanguíneo de la extremidad posterior de los animales. Para evitar que el tejido se secase, el músculo fue continuamente humidificado con solución salina (una gota por segundo), mantenida a temperatura ambiente (21-23 °C). El tendón distal del músculo fue atado firmemente con hilo quirúrgico a un gancho de acero inoxidable conectado a un transductor de fuerza (Grass, Modelo FT03B, Warwick, RI, USA), cuidando de mantener la orientación anatómica normal del músculo, con respecto a la extremidad (orientación horizontal).

Se provocaron sacudidas simples o respuestas tetánicas isométricas del músculo EDL mediante la aplicación de pulsos únicos de voltaje (0.5 ms de duración, cada 10 s) para las sacudidas simples y o trenes de pulsos con distintas frecuencias (1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, y 100 Hz), respectivamente, mediante un par de electrodos de plata finos insertado en cada extremo, distal y proximal, de los músculos (entre el límite del tendón y el tejido muscular). Los electrodos fueron conectados a una unidad de aislamiento del estímulo (Device type 2533) y a un generador de pulsos (Digitimer devices, Model 3290). Posteriormente se determinó el umbral de estimulación (T) al incrementar gradualmente la intensidad del estímulo desde cero hasta que se observará una respuesta contráctil, apenas discernible por parte del músculo (la cual fue considerada como la intensidad umbral del estímulo). Subsecuentemente la intensidad del estímulo se incrementaba de manera gradual hasta observar que la mayoría de las fibras en el músculo fuesen activadas (intensidad máxima), la cual usualmente era de 3 veces umbral (3 x T). Posteriormente, el músculo fue estirado gradualmente para determinar la longitud óptima (L_o) y la fuerza neta de la sacudida simple. La respuesta contráctil del músculo fue registrada con un preamplificador de DC (Grass Mod. 7DAF), conectado en serie a un osciloscopio (Tektronix, mod. 460A) y una computadora personal. La respuesta del músculo fue digitalizada, almacenada y subsecuentemente analizada con un programa de computo comercial (WaveStarTM, Version 1, Tektronix). Al final del experimento, el músculo EDL fue extraído y pesado (MW), y el animal fue sacrificado con una sobredosis de anestésico (Uretano). Subsecuentemente, el sistema de medida fue calibrado usando una serie de barras de metal de peso conocido (1-200 g). Después del experimento, la amplitud del pico de la respuesta contráctil fue medida con un par de cursores (incluidos en el programa de computo Webstar), uno localizado en la base y otro en el pico de la respuesta contráctil, y expresada en Newtons (N) y normalizada con respecto al peso húmedo del músculo (gramos de tejido húmedo; N/g.w.t.; [Toscano, et al. 2008](#)). El tiempo al pico y el tiempo medio de relajación de la sacudida simple

fueron medidos también con los mismos cursores y los resultados expresados en milisegundos (ms).

7.4. Análisis del porcentaje de peso corporal y músculos EDL

El porcentaje de ganancia de peso corporal y de los músculos EDL de las ratas control y desnutridos fue calculado de la pendiente de la fase exponencial de las curvas de ganancia de peso (entre los días PN20 y PN60; (véase Figuras. 10 y 11, tablas 4-A y 4-B). Se reportan los valores promedio \pm DE. Las diferencias entre las diversas condiciones de alimentación, género y grupos de edad fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y con la prueba post-hoc **False Discovery Rate FDR**; (Benjamini y Hochberg, 2000). $P < 0.001$ a $P < 0.05$ indican las diferencias significativas entre grupos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa Graph Pad Prism® (version 6.0; 2007; San Diego, CA, USA).

8. RESULTADOS

8.1. Peso corporal y peso del músculo EDL

El peso corporal (PC) de las ratas macho controles (MC) y las hembras controles (HC) muestran diferencias significativas (ANOVA de dos vías y la prueba post hoc False Discovery Rate FDR, $P < 0.001$) lo que indica que existen diferencias de género en este parámetro entre los días PN20 al PN365. Sin embargo, el peso corporal de los machos desnutridos (MD) y de las hembras desnutridas (HD), en todas las edades analizadas, no muestran diferencias significativas entre sí (Figura 10-A y B). Además, las ratas MD y HD tuvieron significativamente menos peso corporal que los animales control de ambos géneros (FDR post hoc test, $P < 0.001$ y $P < 0.001$, respectivamente (véase figura 10 y tablas 4-A y 4-B).

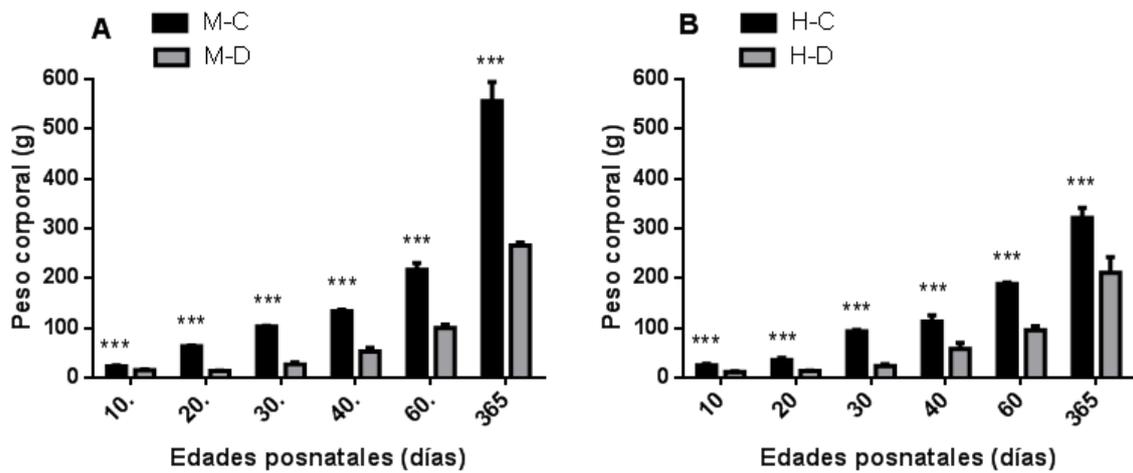


Figura 10.- Peso corporal de ratas hembras (H) y machos (M) control (C) y desnutridos (D) a diferentes edades posnatales. Valores media \pm DE. (nueve músculos de ratas hembra y doce de machos fueron usadas por edad y condición alimenticia) Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos control y desnutridos (ANOVA de dos vías con post prueba FDR *post hoc* test; *** P < 0.001).

Todos los grupos de animales mostraron una ganancia de peso de manera exponencial entre el PN20 y el PN60, teniendo las ratas macho y hembras control mayor tasa de ganancia de peso por día (MC: 3.8 g PC/día y HC: 3.4 g PC/día); mientras que las ratas desnutridas mostraron menor ganancia de peso corporal por día (MD: 1.79 g y HD: 1.8 g PC/d).

De manera concomitante al peso corporal, el peso del músculo EDL y el porcentaje de ganancia de peso del músculo fue significativamente menor en las ratas MD y HD (MC: 2.2 vs MD: 1.2; HC: 1.9 vs HD: 1.1 mg de peso del músculo/día; ("PM/día") que la presentada por los músculos EDL de ratas controles (FDR *post hoc* test, P < 0.001; Figura 11). Sin embargo, resulta notable que la reducción del peso del músculo EDL de las ratas MD y HD no fue acompañada por una disminución en el número total de fibras en todas las edades posnatales. De acuerdo con los resultados obtenidos en relación al peso corporal y del músculo EDL, puede considerarse que los animales utilizados en este estudio manifestaron un grado de desnutrición severa.

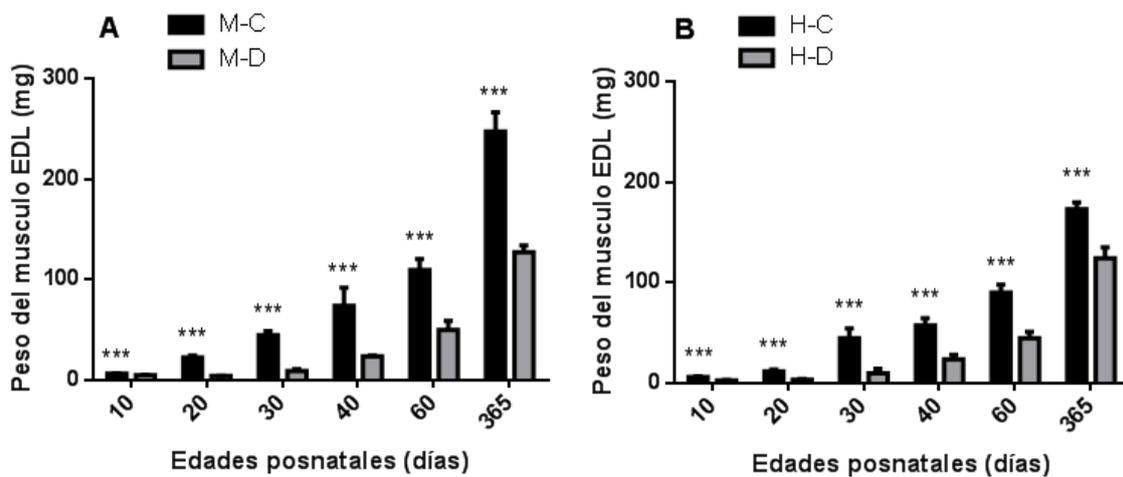


Figura 11.- Peso del músculo EDL de ratas hembras (H) y machos (M) control (C) y desnutridos (D) a diferentes edades posnatales. Valores media \pm SD. (Nueve músculos de ratas hembra y doce de machos fueron usadas por edad y condición alimenticia) Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos control y desnutridos (ANOVA de dos vías con post prueba FDR post hoc test; *** P < 0.001).

8.2. Requerimientos de energía

En todas las edades posnatales analizadas, las ratas MD y HD presentaron una reducción significativa en los requerimientos de energía de mantenimiento (Maintenance Energy, Kcal/día) y de la tasa metabólica basal (Metabolic Basal Rate, H Kcal) en comparación de las ratas controles (FDR post hoc test, P<0.001 (Véase figuras 12 y 13 y Tablas 4-A y 4-B).

Así mismo, en edades tempranas (PN20 a PN30 días) las ratas MD y HD, a pesar de haber recibido el 50% de alimento consumido por los controles, presentan un consumo de energía (respecto al peso corporal) mayor que los controles (Energy Intake/BW Kcal/g BW; Tablas 4-A y 4-B). En el resto de las edades estudiadas el consumo de energía por gramo de peso corporal de las ratas desnutridas de ambos géneros fue semejante al de los grupos controles.

Es importante destacar que el aporte de energía indispensable para mantener la vida (Energía de mantenimiento; Kcal/día) y la tasa metabólica basal (H Kcal; definida ésta como la proporción del metabolismo en la que el cuerpo en reposo utiliza la energía para mantener las funciones vitales), tanto de ratas MD como de HD es menor que las de las ratas controles, en todas las edades estudiadas. Estos resultados son congruentes si se considera que el cálculo de la energía de mantenimiento y de la tasa metabólica

basal se encuentra relacionadas con el peso corporal (véase tablas 4-A, 4-B y ecuaciones de Keenan, et al. 1996 y National Research Council, 1995).

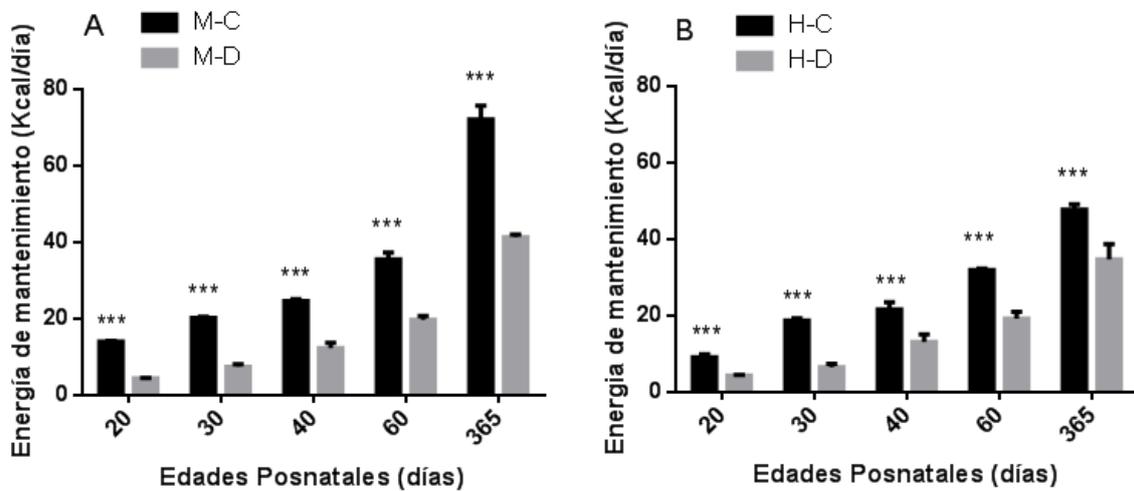


Figura 12.- Energía de mantenimiento de ratas hembras (H) y machos (M) control (C) y desnutridos (D) a diferentes edades posnatales. Valores: Media \pm DE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos control y desnutridos (ANOVA de dos vías con post prueba FDR post hoc test; *** P < 0.001).

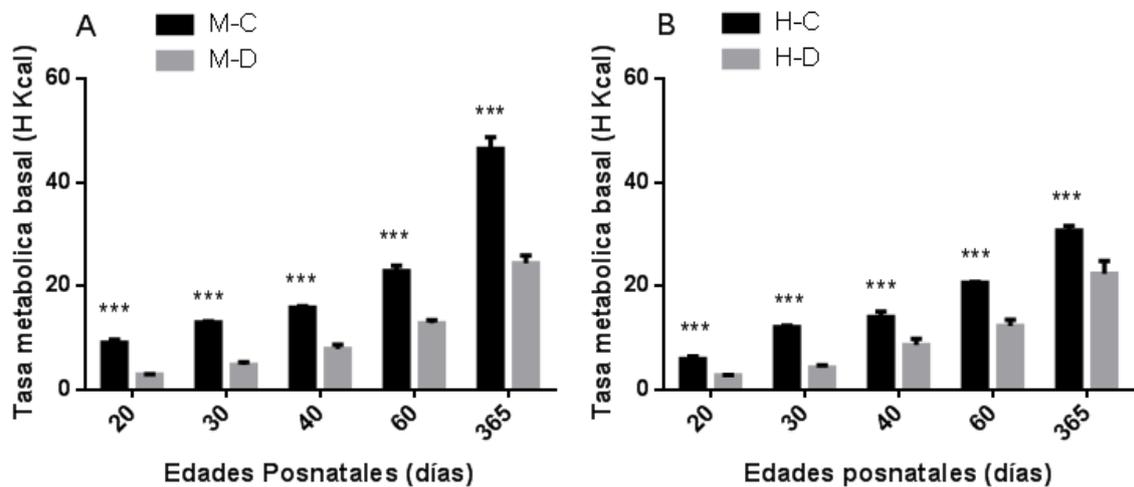


Figura 13.- Tasa metabólica basal de ratas hembras (H) y machos (M) control (C) y desnutridos (D) a diferentes edades posnatales. Valores: Media \pm DE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos control y desnutridos (ANOVA de dos vías con post prueba FDR post hoc test; *** P < 0.001).

8.3. Composición de tipos de fibras de los músculos EDL de machos y hembras

El número total de fibras contenidas en los músculos EDL de las ratas HD y MD no fue significativamente diferente que el de los músculos EDL de las ratas HC y MC, en la mayoría de las edades posnatales analizadas (FDR post hoc test, $P < 0.01$ y $P < 0.05$ respectivamente), con excepción del día PN365, cuando se presenta una reducción en el número de fibras en los músculos de las ratas HD y MD (tablas 5-A y 5-B).

Con la tinción de la m ATPasa (pH 4.7), observamos que el porcentaje de fibras tipo I (lentas) en los músculos EDL de las ratas HD fue similar al determinado en los animales hembra controles, en la mayoría de las edades estudiadas, con la excepción del día 365PN, cuando el porcentaje fue mayor en los músculos de los animales desnutridos (tablas 5-A y 5-B). En contraste, entre los días PN40, PN60 y PN365 se determinó una reducción significativa en el porcentaje de fibras tipo I en los músculos EDL de las ratas MD (50-60% reducción; FDR post hoc test, $P < 0.05$ y $P < 0.01$; Tablas 5-A y 5-B).

Por otro lado, la proporción de fibras tipo IIA y IIB en los músculos EDL de las ratas HD no fue diferente al de los controles (tablas 5-A y 5-B). En contraste, una reducción en el porcentaje de fibras Tipo IIA en los músculos EDL de ratas MD fue observado en todas las edades estudiadas (disminución significativa de 6-12%; FDR *post hoc* test, $P < 0.01$ y $P < 0.001$; Tablas 5-A y 5-B), lo cual fue acompañado por un incremento proporcional en el porcentaje de fibras tipo IIB (6-18% de incremento). Los valores calculados de la relación $R_{IIB/IIA}$ para los músculos EDL de los MD fueron mayores que el de los músculos controles en todas las edades posnatales, estableciéndose el mayor valor en el día PN40 (ver figura 14-A). En contraste, no se observaron diferencias en los valores de $R_{IIB/IIA}$ entre músculos de HC y HD excepto en el día PN40, cuando ocurre un incremento importante en la proporción de fibras IIB respecto a las IIA (FDR *post hoc* test, $P < 0.01$; figura 14-B).

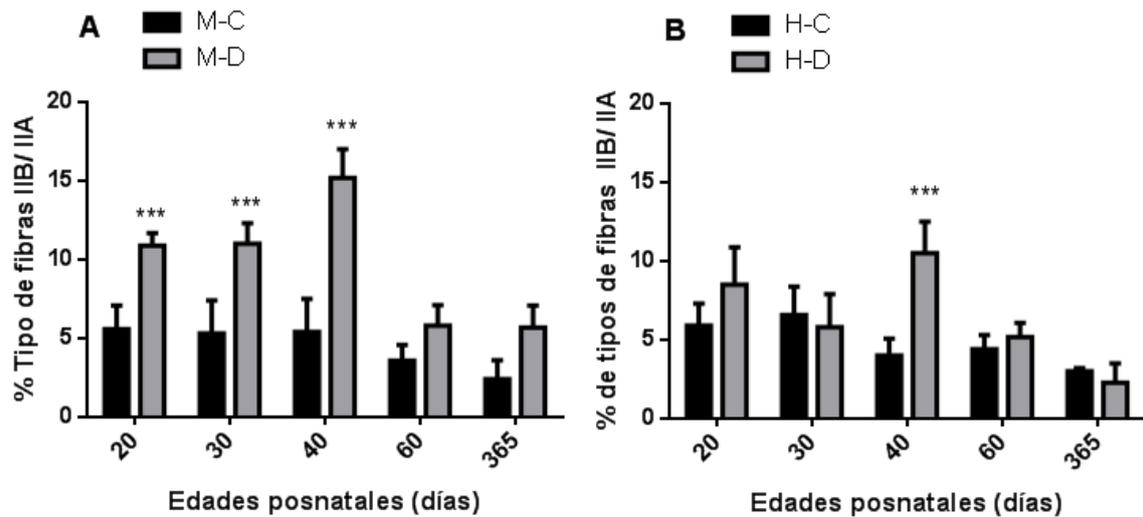


Figura 14.- Proporción relativa de tipos de fibras en los músculos. Las gráficas ilustran el valor medio (\pm DE) de la proporción relativa de las fibras tipo IIB y tipo IIA ($R_{IIB/IIA}$) en los músculos EDL de ratas machos (A) y hembras (B) control y desnutridas a diferentes edades posnatales (nueve músculos EDL de la pierna izquierda de hembras y doce de machos fueron usados por edad y condición alimenticia). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los músculos de las ratas control y desnutridas (FDR post-hoc test; *** $P < 0.001$).

Tabla 4-A: Peso corporal e ingreso de energía en ratas hembra controles y desnutridas de varias edades posnatales.

Edad (días)	Peso corporal (g)	Consumo de comida (g/día)	Consumo de energía (kcal/día)	Consumo de energía/PC (kcal/g PC)	Combustible Fisiológico (kcal/día)	Energía Metabolizable (kcal/día)	Energía de Mantenimiento (kcal/día)	Tasa Metabólica Basal (H kcal)
Hembras								
Control (HC)								
10	24.6±3
20	35.7±4	4.8	19.9	0.55	16.8	15.8	9.1±0.8	5.9±0.5
30	93.2±3	12.1	50.2	0.53	42.3	40.0	18.8±0.4	12.1±0.3
40	112.9±12	16.2	67.2	0.59	56.7	53.6	21.6±1.8	14.0±1.1
60	188.1±3	17.3	71.7	0.38	60.5	57.2	31.9±0.3	20.6±0.2
365	321.1±13	20.3	84.2	0.26	71.0	67.1	47.7±1.4	30.7±0.9
Hembras								
Desnutridas (HD)								
10	11.4±1***
20	13.3±0***	2.4	9.9	0.74	8.4	7.9	4.3±0.1***	2.8±0.1***
30	23.1±4***	6.0	24.9	1.07	21.0	19.8	6.6±0.8***	4.3±0.4***
40	58.3±11***	8.1	33.6	0.57	28.3	26.8	13.2±1.9***	8.6±1.2***
60	95.3±8***	8.6	35.6	0.37	30.1	28.4	19.2±1.8***	12.3±1.2***
365	210.7±31***	10.	41.9	0.19	35.3	33.4	34.7±4.0***	22.4±2.5***

Requerimiento de energía de mantenimiento = $112 \text{ kcal PC } \kappa\text{g}^{0.75} / \text{día}$ (Keenan, et al. 1996); Tasa metabólica basal: $H_{(\text{kcal})} = 72 \text{ PC } \kappa\text{g}^{0.75}$ (National Research Council 1995). C: controles, D: desnutridos, PC: peso corporal. Cada punto representa los valores promedio \pm DE de nueve ratas hembras (H) por edad y condición alimenticia. FDR post hoc test, *** $P < 0.0001$.

Tabla 4-B: Peso corporal e ingreso de energía de ratas macho controles y desnutridas de varias edades posnatales.

Edad (días)	Peso corporal (g)	Consumo de comida (g/día)	Consumo de energía (kcal/día)	Consumo de energía/PC (kcal/g PC)	Combustible Fisiológico (kcal/día)	Energía Metabolizable (kcal/día)	Energía de Mantenimiento (kcal/día)	Tasa Metabólica Basal (H kcal)
Machos								
Control (MC)								
10	22.9±1.8
20	63.3±1.6	4.6	19.0	0.30	16.1	15.2	14.0±0.2	9.1±0.1
30	102.5±1.9	12.1	49.6	0.48	41.3	40.0	20.2±0.3	13.0±0.2
40	133.5±3.4	16.6	68.8	0.51	58.1	54.9	24.6±0.4	15.9±0.2
60	217.0±13.6	23.0	94.3	0.43	80.5	76.1	35.6±1.6	22.9±1.0
365	556.4±37.7	29.2	121.1	0.21	102.2	96.6	72.1±3.6	46.4±2.3
Machos								
Desnutridos (MD)								
10	15.4±1.6***
20	13.7±0.8***	2.3	9.5	0.69	8.0	7.6	4.4±0.1***	2.9±0.1***
30	26.8±4.3***	6.0	24.9	0.92	21.0	19.8	7.4±0.8***	4.8±0.5***
40	52.6±7.4***	8.3	34.4	0.65	29.0	27.4	12.3±1.4***	7.9±0.8***
60	99.6±7.3***	11.5	47.7	0.47	40.2	38.0	19.8±1.0***	12.8±0.6***
365	265.7±6.0***	14.6	60.5	0.22	51.1	48.3	41.3±0.7***	24.4±1.4***

Requerimiento de energía de mantenimiento = 112 kcal PC Kg 0.75 / día (Keenan, et al. 1996); Tasa metabólica basal: H (kcal) = 72 PC kg^{0.75} (National Research Council 1995). C: controles, D: desnutridos, PC: peso corporal. Cada punto representa los valores promedio ± DE de nueve ratas machos (M) por edad y condición alimenticia. FDR post hoc test, *** P< 0.0001.

Tabla 5-A: Número y porcentaje de tipos de fibras en el músculo EDL de ratas hembra controles y desnutridos en varias edades posnatales.

Hembras Edades (días)	Número de fibras		Fibras Tipo I		Fibras Tipo IIA		Fibras Tipo IIB	
	C (N)	D (N)	C (%)	D (%)	C (%)	D (%)	C (%)	D (%)
20	4416.4 ± 672.9	4276.4 ± 567.0	5.4 ± 0.3	5.1 ± 0.7	13.7 ± 2.6	9.9 ± 1.4	81.6 ± 3.8	84.3 ± 3.5
30	3546.8 ± 488.9	3695.3 ± 386.8	4.8 ± 1.1	5.0 ± 0.8	12.4 ± 2.8	13.9 ± 1.9	82.3 ± 5.0	81.2 ± 4.2
40	4012.8 ± 384.4	3425.8 ± 408.3	4.3 ± 0.9	3.3 ± 0.6	18.9 ± 7.3	8.2 ± 2.1	77.1 ± 8.3	86.9 ± 4.2
60	3328 ± 530.5	3561.1 ± 284.3	3.5 ± 0.7	2.7 ± 0.6	17.8 ± 3.1	15.7 ± 1.8	78.8 ± 3.0	81.8 ± 1.7
365	3107.6 ± 176.4	2521.0 ± 134.9**	2.1 ± 0.2	3.8 ± 0.4**	23.2 ± 6.3	28.5 ± 3.3	70.7 ± 1.6	68 ± 4.2

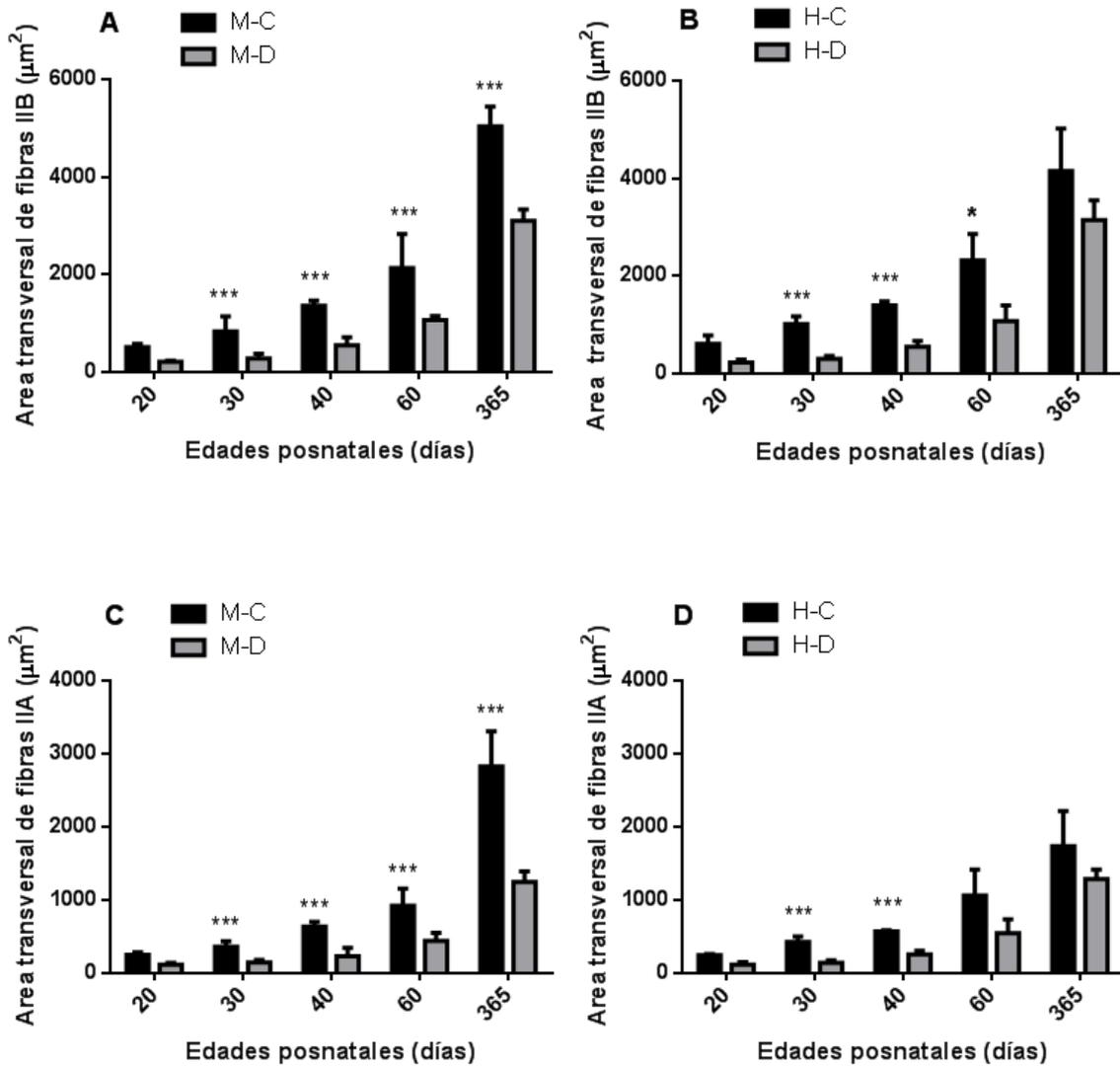
Cada punto representa los valores promedio ± DE. C: controles y D: Desnutridos. Datos obtenidos de nueve y doce músculos EDL de la pierna izquierda de ratas hembras respectivamente, por edad y condición alimenticia. FDR post-hoc test, **P < 0.01; N: Número de fibras. %: Porcentaje de fibras.

Tabla 5-B: Número y porcentaje de tipos de fibras en el músculo EDL de ratas macho controles y desnutridos en varias edades posnatales.

Machos Edades (días)	Número de fibras		Fibras Tipo I		Fibras Tipo IIA		Fibras Tipo IIB	
	C (N)	D (N)	C (%)	D (%)	C (%)	D (%)	C (%)	D (%)
20	4127.1 ± 725.7	3988.0 ± 576.0	4.9 ± 0.7	5.4 ± 1.2	14.5 ± 2.5	8.1 ± 1.9**	81.7 ± 4.0	88.3 ± 1.7*
30	4007.2 ± 331.5	4308.0 ± 928.6	3.9 ± 0.7	4.5 ± 0.1	14.9 ± 0.2	8.0 ± 1.8**	80.4 ± 1.1	88.9 ± 2.5**
40	3981.8 ± 281.2	4005.3 ± 710.7	4.0 ± 0.2	1.6 ± 0.2**	14.5 ± 1.8	5.9 ± 0.3***	78.6 ± 9.3	90 ± 1.8*
60	3611.0 ± 414.0	3629.2 ± 296.1	3.0 ± 0.3	2.2 ± 0.7*	20.4 ± 2.0	14.5 ± 3.2**	74.4 ± 2.5	85.4 ± 5.7**
365	2966.6 ± 237.3	3629.2 ± 165.2*	6.2 ± 0.9	1.6 ± 0.2**	27.0 ± 4.7	14.4 ± 2.2**	65.3 ± 5.7	83.2 ± 3.3*

Cada punto representa los valores promedio ± DE. C: controles y D: Desnutridos. Datos obtenidos de nueve y doce músculos EDL de la pierna izquierda de ratas macho respectivamente, por edad y condición alimenticia. FDR post-hoc test, * P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001. N: Número de fibras. %: Porcentaje de fibras.

En todas las edades posnatales analizadas, los tres tipos de fibras identificados por su actividad ATPasa en los músculos EDL de las ratas hembra y macho desnutridas mostraron una reducción significativa en su área de sección transversal (figura 15) y en el área transversal total del músculo, ocupada por las fibras (A_T), comparada con los músculos EDL de las ratas controles (FDR post hoc test, $P < 0.01$; Tabla 6).



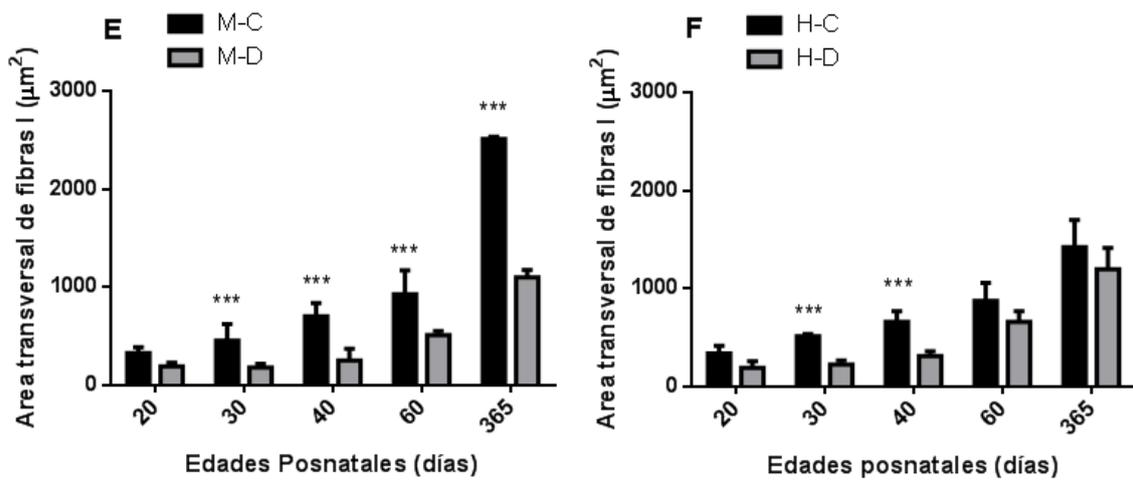


Figura 15. Área de sección transversal de los tipos de fibras de los músculos EDL. Las gráficas muestran el valor medio (\pm DE) de las áreas de sección transversal de los tipos de fibras en los músculos EDL de ratas controles y desnutridas hembras (B, D y F) y machos (A, C y E) a diferentes edades posnatales (datos obtenidos de nueve músculos EDL de la pata izquierda de ratas hembras y doce de ratas machos, por edad y condición alimenticia). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los músculos de las ratas controles y desnutridas (FDR *post-hoc* test; *** $P < 0.001$). HC: hembras controles; HD: hembras desnutridas; MC: machos controles; MD: machos desnutridos.

Estos resultados muestran que la desnutrición inducida por la dieta empleada en este estudio provocó que las fibras contenidas en el músculo EDL de las ratas machos y hembras desnutridas presentaran menor área transversal, sin que ocurriera una reducción significativa en el número total de fibras con respecto a los músculos EDL de animales controles (Tablas 5-A y 5-B).

Por otro lado, nuestros datos también indican que la desnutrición crónica severa afecta principalmente a los porcentajes de fibras rápidas (IIB y IIA), se observó un incremento en el número de las primeras y una disminución en las segundas, en los músculos EDL de las ratas macho pero no en los de las hembras.

Así, estos resultados apoyan observaciones previas que indican que la técnica de m-ATPasa es incapaz de diferenciar claramente el tipo de fibras en edades tempranas (por ejemplo en el día PN10) del desarrollo de las ratas (Ho, et al. 1983).

ÁREA DE SECCIÓN TRANSVERSAL TOTAL OCUPADA POR LAS FIBRAS EN LOS MÚSCULOS EDL DE RATAS CONTROLES Y DESNUTRIDAS				
EDAD	HEMBRAS		MACHOS	
Días	Controles	Desnutridas	Controles	Desnutridos
20	2.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1*	1.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1*
30	2.6 ± 1.3	0.9 ± 0.1**	2.5 ± 0.1	1.1 ± 0.07 **
40	4.4 ± 0.3	1.7 ± 0.2**	4.2 ± 0.6	1.1 ± 0.1 **
60	6.6 ± 1.0	3.3 ± 0.2**	5.4 ± 1.0	0.9 ± 0.1 **
365	9.2 ± 0.1	5.8 ± 0.1**	13.1 ± 1.5	8.6 ± 0.5 ***

Tabla 6.- Área de sección transversal total (At) en milímetros cuadrados (mm²). Ocupada por las fibras en músculos EDL de ratas hembras y machos controles y desnutridas en varias edades posnatales. Valores de la media ± DE. Nueve y doce músculos EDL de la pierna izquierda de hembras y machos respectivamente fueron usados por edad y condición alimenticia. FDR, *post-hoc* test, * P<0.05; ** P<0.01; *** P < 0.001.

8.4. Respuesta contráctil del músculo EDL de ratas machos y hembras

A partir de diversas observaciones experimentales, se ha propuesto que la composición relativa de los distintos tipos de fibras presentes en los músculos influye de manera directa sobre la fuerza contráctil de los mismos (Brozanski, et al. 1993; Pette y Staron, 2000) y que las fibras del Tipo IIB generan más fuerza contráctil que los otros tipos de fibras (Bottinelli, 2001). En base a lo anterior, sería de esperar que una mayor proporción de fibras del Tipo IIB, como el descrito en la sección anterior provocara un incremento proporcional en la fuerza contráctil producida por el músculo EDL de los animales desnutridos. La propuesta anterior fue explorada en la presente serie de observaciones. La Figura 16 ilustra los registros obtenidos de las respuestas generadas por estímulos eléctricos únicos (1 Hz) aplicados al músculo EDL de ratas hembras y macho controles y desnutridos, cuya magnitud fue normalizada de acuerdo al peso del músculo.

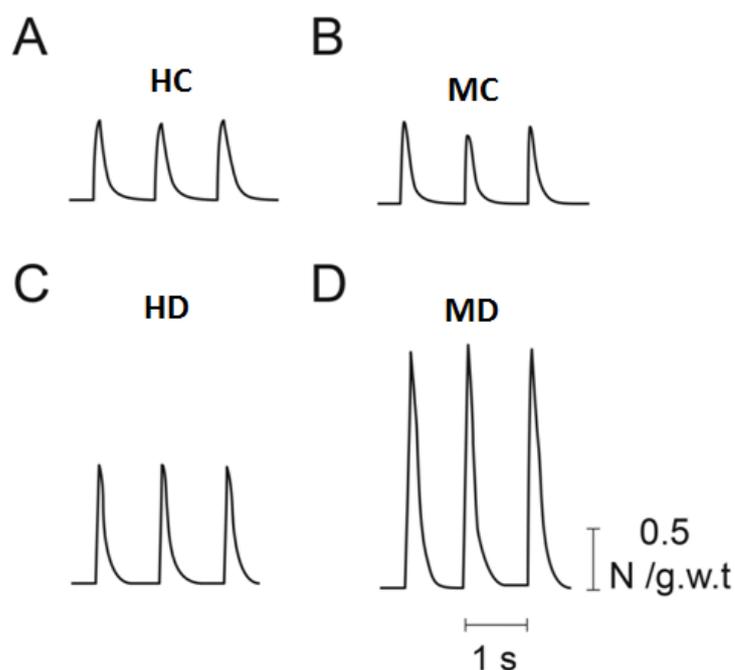


Figura 16.- Respuesta contráctil de músculos controles y desnutridos. Registro de una sacudida simple provocada por un estímulo eléctrico (1 pulso por segundo, de 0.5 ms de duración $3 \times T$) aplicado al músculo EDL de ratas controles (A y B) y desnutridas (C y D) hembras (HC y HD) y machos (MC y MD) de 40 días de edad. Fuerza normalizada y barras de tiempo de calibración aplicadas durante todo el registro.

En las tablas 7-A y 7-B se muestran los valores promedio \pm DE de la fuerza normalizada generada durante sacudidas simples (“twitch”) de los músculos EDL de ratas, hembras y machos respectivamente, con distintas edades posnatales. Es importante destacar, que los músculos EDL de las ratas macho desnutridas generan mayor fuerza normalizada que los controles, particularmente entre los días PN20 al PN365 (FDR, *post hoc* test, $P < 0.001$; Figura 17 y tablas 7-A y 7-B).

De manera similar, las respuestas tetánicas provocadas por trenes de estímulos (100 Hz) aplicadas a los músculos EDL de machos desnutridos generaron mayor fuerza normalizada que la de los animales controles, desde el día PN30 al PN365 (FDR, *post hoc* test, $p < 0.001$; Tabla 7-B). Sin embargo, la fuerza contráctil normalizada durante la sacudida simple y la contracción tetánica de los músculos EDL de las hembras desnutridas y de las controles no presentaron diferencias significativas entre sí, en la mayoría de las edades posnatales analizadas, con excepción de los días PN30 y PN365, cuando se observa que los músculos desnutridos desarrollan mayor fuerza normalizada

en la sacudida simple que los controles (FDR *post hoc* test, $p < 0.01$; (figura 17 y tabla 7-A y 7-B).

El tiempo al pico y el tiempo medio de relajación de la sacudida simple provocada en los músculos EDL de las ratas hembras y machos desnutridos fue similar en la mayoría de las edades estudiadas, con excepción de la edades pre-destete PN10 y PN20, cuando las respuestas contráctiles de los músculos de animales desnutridos de ambos géneros, presentaron valores promedio de tiempo al pico y de relajación mayores que los controles (FDR *post hoc* test, $P < 0.05$; ver tabla 7-A y 7-B)

Para establecer una posible relación entre la proporción relativa de las fibras Tipo IIB y la fuerza normalizada de la sacudida simple de los músculos EDL de las ratas hembras y machos controles y desnutridas se calculó el coeficiente de correlación entre ambas variables.

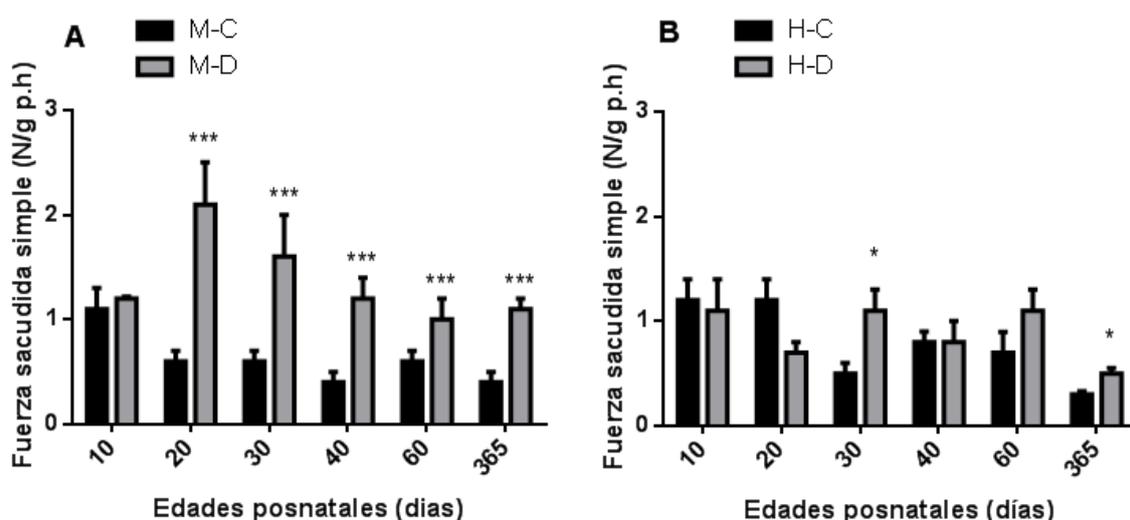


Figura 17.- Fuerza normalizada de los músculos EDL controles y desnutridos. Las gráficas ilustran los valores de la media (\pm DE) de la fuerza normalizada en la sacudida simple por los músculos EDL de ratas machos (A) y hembras (B) control (C) y desnutridos (D) a diferentes edades posnatales. (Nueve músculos EDL de la pierna derecha de hembras y doce de músculos de machos fueron usados por edad y condición alimenticia). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las respuestas en los músculos de los animales control y desnutridos (FDR *post-hoc* test; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

Tabla 7-A.- Características contráctiles del músculo EDL de ratas hembra, controles y desnutridos en varias edades posnatales.

Hembras Edades (días)	Fuerza normalizada Sacudida simple (t) (N/g.p.h.)		Fuerza tetánica normalizada (T) (N/g.p.h.)		Tiempo-al-pico (mseg)		Tiempo de relajación (mseg)	
	C	D	C	D	C	D	C	D
10	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.3	5.2 ± 1.5	5.5 ± 1.2	39.8 ± 4.0	53.1 ± 6.4 *	44.5 ± 3.3	54.4 ± 8.8
20	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.1	8.9 ± 1.4	10.6 ± 1.9	33.0 ± 2.7	41.8 ± 3.1 *	35.0 ± 2.5	42.7 ± 3.1**
30	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2 *	7.4 ± 0.6	9.4 ± 1.2 *	30.9 ± 1.9	32.5 ± 2.0	35.1 ± 3.2	37.0 ± 3.6
40	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	8.1 ± 0.5	9.9 ± 0.6 *	30.4 ± 2.2	32.8 ± 2.9	32.9 ± 2.2	35.0 ± 2.8
60	0.7 ± 0.2	1.1 ± 0.2	9.3 ± 1.6	9.6 ± 1.3	29.8 ± 2.9	33.9 ± 4.5	28.5 ± 1.9	25.6 ± 3.1
365	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.0*	4.2 ± 0.6	5.1 ± 0.8	27.6 ± 2.9	32.3 ± 1.5	27.0 ± 5.9	29.8 ± 2.2

Valores de la media ± DE. C: Ratas controles y D: Desnutridas. Nueve músculos de la pierna derecha de hembra y doce músculos de machos fueron usados por edad y condición alimenticia. FDR post-hoc test, *P < 0.05, ** P < 0.01). N/g.p.h. Newtons/gramo. Peso húmedo

Tabla 7-B.- Características contráctiles del músculo EDL de ratas macho, controles y desnutridos en varias edades posnatales.

Machos Edades (días)	Fuerza normalizada Sacudida simple (t) (N/g.p.h.)		Fuerza tetánica normalizada (T) (N/g.p.h.)		Tiempo-al-pico (mseg)		Tiempo de relajación (mseg)	
	C	D	C	D	C	D	C	D
10	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.0	11.9 ± 1.9	10.2 ± 2.1	41.7 ± 4.5	49.9 ± 9.1	40.8 ± 2.7	48.0 ± 2.9 **
20	0.6 ± 0.1	2.1 ± 0.4 ***	8 ± 1.3	9.1 ± 1.2	26.6 ± 4.8	36.6 ± 3.0 **	29.6 ± 2.6	34.7 ± 3.4
30	0.6 ± 0.1	1.6 ± 0.4 ***	7.1 ± 0.8	12.5 ± 1.2 ***	25.2 ± 3.1	30.1 ± 5.3	28.5 ± 2.6	30.5 ± 3.2
40	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.2 ***	6.6 ± 0.8	10.3 ± 0.6 ***	23.8 ± 4.1	28.1 ± 4.9	27.3 ± 3.4	29.8 ± 2.4
60	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2 ***	8.3 ± 0.7	10.3 ± 0.6 **	19.9 ± 1.9	24.0 ± 3.7	24.3 ± 1.9	25.6 ± 3.1
365	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1 ***	5 ± 0.9	10.3 ± 0.6 ***	26.2 ± 4.1	25.9 ± 6.6	28.2 ± 5.8	23.9 ± 3.4

Valores de la media ± DE. C: Ratas controles y D: Desnutridas. Nueve músculos de la pierna derecha de hembra y doce músculos de machos fueron usados por edad y condición alimenticia. FDR post-hoc test, ** P < 0.01; ***P < 0.001). N/g.p.h. Newtons/gramo. peso húmedo

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con los resultados obtenidos comprobamos la hipótesis de que la restricción alimenticia crónica afecta la proporción de tipos de fibras rápidas y la mecánica contráctil del músculo Extensor *Digitorum longus* (EDL), tanto de ratas macho como de hembras, valorados desde el importante decremento en el peso corporal y en el peso del músculo EDL de las ratas desnutridas en comparación con los animales control de ambos géneros. Además, concuerdan con los estudios de diversos investigadores, quienes han propuesto que una considerable pérdida de peso corporal (~40% a 50%) es representativo de desnutrición severa (Cortés-Barberena, et al. 2008; Keenan, et al, 1996; Sousa-Melo, et al. 2013). De acuerdo con lo anterior, proponemos que el régimen dietético utilizado en este estudio es una restricción crónica, no solo de energía sino también de nutrientes esenciales que inducen una desnutrición severa en los animales experimentales. Propuestas similares han sido reportadas en otros estudios (Rowe, 1968; Ruiz-Rosado, et al. 2013), en donde se sugiere una estrecha relación entre bajo ingreso de alimento y una reducción del peso corporal y del peso del músculo de las crías.

Cuando la desnutrición ocurre en estadios tempranos afecta negativamente el crecimiento y la maduración de los tejidos y de las células, alterando la organización y función de los órganos y/o sistemas de los organismos (Ihemelandu, 1985; Zhu, et al. 2006). La evidencia obtenida en el presente estudio está de acuerdo con tal propuesta, ya que se observó una marcada reducción en el porcentaje de ganancia de peso corporal y de peso de los músculos EDL en las ratas machos y hembras desnutridas. Aunado a lo anterior, se estableció una mayor pérdida de peso corporal en los machos que en las hembras, de tal manera que se podría proponer que las ratas machos son más susceptibles que las ratas hembras a la restricción nutricional crónica severa (pre y posnatal).

La reducción en la energía de mantenimiento y en la tasa metabólica basal observada en las ratas MD y HD puede explicarse si se considera que las ecuaciones empleadas para su cálculo (Keenan, et al. 1996 y National Research Council 1995) están directamente relacionadas con la magnitud del peso corporal de los animales. Estos resultados, sugieren que la reducción del peso corporal que presentan los animales sometidos a una restricción crónica severa de alimento pudiera ser vista como una

respuesta fisiológica adaptativa, que permitiría a los animales por un lado remediar o subsanar el bajo aporte de energía de la dieta y por el otro, provocar una disminución en la tasa metabólica basal del organismo en reposo (cantidad de energía necesaria para mantener las funciones vitales del cuerpo en reposo) permitiendo una mejor utilización de la energía. Esta respuesta fisiológica dual (menor energía de mantenimiento y disminución del gasto de energía para mantener las funciones vitales) resulta ser de mayor magnitud y ocurre durante mayor tiempo en los machos desnutridos que en las hembras desnutridas comparado con sus controles (Tablas 4-A y 4-B, figuras 12 y 13).

De acuerdo con nuestros resultados, es factible que las ratas macho desnutridas utilicen la respuesta metabólica de ahorro de energía de manera más eficiente y/o diferente que las ratas hembras desnutridas. Posiblemente, lo anterior sea debido a que los machos, a diferencia de las hembras e independientemente del régimen alimenticio en que estén sometidos, tienen mayores requerimientos energéticos (para la síntesis de tejido muscular esquelético y para la ejecución de una mayor actividad física, competencia, etc.).

Se ha propuesto que la reducción del peso de los músculos de los animales desnutridos se encuentra asociada a la pérdida de proteínas y/o al decremento de la área y volumen de las fibras (“hipotrofia”), así como a una disminución en el número total de fibras (“hipoplasia”) (Hegarty y Kim, 1980; Layman, et al. 1981). Algunos estudios han mostrado que la desnutrición prenatal disminuye el número total de fibras en los músculos lumbrical y soleo de ratas recién nacidas (Wilson, et al. 1988; Ameredes, et al. 1999), también se ha reportado que la restricción alimenticia en las ratas disminuye el número de fibras en el musculo EDL (Boreham, et al. 1988). Sin embargo ninguno de los estudios mencionados presenta evidencia de procesos de fusión o degeneración de las fibras, lo cual es necesario para explicar una desaparición verdadera de células en los músculos (Boreham, et al. 1988). También es posible que en los estudios donde se reporta una disminución de fibras, el complemento total de fibras (fibras no contadas) pueda no estar incluida en un corte transversal de la parte media del musculo debido su arquitectura (Boreham, et al. 1988).

Por otro lado, existen otros estudios donde los investigadores han reportado que el número de fibras en los músculos no se altera durante el desarrollo posnatal de ratas y cerdos desnutridos (McCarter, et al. 1978; Dwyer, et al. 1994). La discrepancia respecto al número total de fibras se puede explicar probablemente por diferencias de edad,

método de conteo, (directo o indirecto), raza de rata y/o arquitectura del musculo estudiado (Boreham, et al. 1988).

Por otro lado, también se ha reportado que la desnutrición disminuye el área (de sección transversa) de las fibras de algunos músculos (Ruiz, et al. 2013; Yamaguchi, et al. 1993), alteraciones similares se han observado en los músculos de cerdos y ovejas (Zhu, et al. 2006; Dermitas y Özcan, 2012.). Independientemente de tales estudios, nuestros resultados indican que la desnutrición crónica severa no afecta el número total de fibras en los musculos EDL de las ratas lactantes, juveniles y adultas jóvenes (de los 20 a los 60 dias de edad), pero si se observa una disminución significativa del número total de fibras en el musculo EDL en las ratas viejas (de 365 dias de edad) desnutridas de ambos generos respecto a sus controles. Asimismo, nuestro estudio demuestra que la desnutrición crónica severa reduce significativamente el área (de sección transversal) de los diferentes tipos de fibras presentes en el músculo EDL, tanto de ratas machos como de las hembras, en todas las edades posnatales estudiadas.

Con base a lo anterior, consideramos que la disminución observada en el peso del músculo EDL de los animales desnutridos resulta de una hipotrofia de las fibras musculares más que de una reducción en el número de fibras musculares en el estadio de lactancia y adulto joven.

La evidencia histoquímica obtenida en el presente estudio muestra que la desnutrición crónica severa (pre y posnatal) induce un incremento relativo en el porcentaje de fibras del Tipo IIB en los músculos EDL de las ratas macho, pero no en los musculos de las ratas hembras, el cual se ve acompañado por un decremento proporcional en el porcentaje de fibras del Tipo IIA, en la mayoría de las edades posnatales analizadas (particularmente en las edades PN20 y PN40). Estas observaciones están parcialmente de acuerdo con las reportadas en diversos estudios previos, en los cuales se muestra que en estadios tempranos de la vida y bajo distintos paradigmas experimentales de privación de alimento (aplicados en diferentes edades posnatales de desarrollo) inducen un incremento en la proporción de fibras rápidas del Tipo IIB en las ratas machos (Zhu, et al. 2006; Toscano, et al. 2008). Sin embargo, son contradictorios con un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, en el que se observó un incremento en la proporción de fibras Tipo IIA a expensas de las fibras del Tipo IIB en el músculo EDL de ratas desnutridas (Ruiz, et al. 2013). Posiblemente, las diferencias en los resultados obtenidos en ambos estudios sean debidas a diferencias en las técnicas histoquímicas empleadas. En el estudio de Ruiz y colaboradores (2013)

se empleó la técnica histoquímica de la m-ATPasa básica (pH 9.3) modificada de Guth y Samaha, (1970), mientras que en este estudio utilizamos la técnica de la m-ATPasa ácida (pH= 4.7) de Lind y Kernell (1991). Por lo anterior, sería conveniente diseñar paradigmas de experimentación, distintos a los de la presente tesis, en donde se identifiquen los distintos tipos de fibras musculares mediante otra clase de técnicas de tinción, como por ejemplo, técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos para cada tipo de miosina. Sin embargo, tal método también está limitado por la disponibilidad y especificidad de los anticuerpos anti-MHC (Stephenson, 2001) y por la existencia de fibras “híbridas”, que presentan tanto miosina rápida como intermedia, lo que de manera análoga a las técnicas histoquímicas, complica la identificación apropiada de los tipos de fibras musculares (Schiaffino y Reggiani, 1996).

Por otro lado, algunos autores han sugerido la existencia de una relación estrecha entre el tipo de fibra y el peso corporal (Kugelberg, 1976; Yamaguchi, et al. 1993) al argumentar que el aumento en la longitud de las extremidades y del peso corporal durante el desarrollo incrementa la demanda de unidades motoras lentas y disminuye la de las unidades motoras rápidas (Tamaki y Uchiyama, 1995). Sin embargo, otros autores señalan que al disminuir experimentalmente el peso de ratas de laboratorio (al suspenderlas en el aire con una hamaca), reduciendo de esa manera la carga que soportan los músculos de las patas les causa una disminución en la proporción de fibras del Tipo I (Elder y McComas, 1987). A partir de esos resultados, surge la posibilidad de que la ganancia de peso corporal y el incremento en la longitud de las extremidades durante el crecimiento de la rata, provoquen una sobrecarga de los músculos de las piernas y por ello una redistribución de los tipos de fibras musculares.

De acuerdo con lo anterior, inicialmente consideramos la probabilidad de que la reducción de peso corporal (menor sobrecarga), observada principalmente en los machos desnutridos, fuera responsable al menos parcialmente, de la disminución en la proporción de fibras Tipo I y del aumento de fibras Tipo IIB observada en los músculos EDL de las ratas macho desnutridas en los días PN40, PN60 y PN365 (véase Tablas 5-A y 5-B). Sin embargo, nuestros resultados no apoyan tales propuestas dado que las hembras a pesar de presentar diferencias significativas en su peso corporal y en el del músculo EDL, no presentan cambios significativos en las proporciones de tipos de fibras en todas las edades estudiadas.

Las diferencias en los resultados obtenidos en los diversos estudios realizados sobre este tema, posiblemente estén relacionados con la extensa variedad de paradigmas

experimentales de privación de alimento que se emplearon en tales estudios, por ejemplo: privación de alimento durante un solo estadio de desarrollo, ya sea durante el embarazo o la lactancia (Bedi, 1994.; Toscano, et al. 2008.); durante estadios tempranos (Zhu, et al. 2006) o bien por la ligadura de los conductos galactóforos de la madre (López-Jiménez, et al. 2013). También podría deberse al uso de diferentes técnicas histoquímicas para la identificación de los tipos de fibras en los músculos (Ruiz et al. 2013 y el presente estudio).

En la actualidad se considera que las características contráctiles de los músculos resultan de la combinación y/o suma de las propiedades mecánicas de las fibras musculares individuales que los componen (Pette, et al., 1999).

Por otra parte, los resultados obtenidos en el análisis de las respuestas mecánicas provocadas en los músculos EDL de animales control y desnutridos de ambos géneros, indican que los músculos de las ratas macho desnutridas generan mayor fuerza (normalizada) durante sacudidas simples y tetánicas que los músculos controles en la mayoría de las edades posnatales estudiadas (particularmente entre los días PN40 y PN60). En cambio, la fuerza contráctil normalizada de los músculos EDL de ratas hembras, desnutridas y controles, no muestra diferencias significativas entre sí, a excepción de la edad PN40, en la que los músculos de las ratas desnutridas generaron mayor fuerza (normalizada) que los de las ratas controles.

El desarrollo normal de los animales completos y su musculatura parece responder a una combinación de factores hormonales, nutricionales y mecánicos (Boreham, et al. 1988).

Algunos autores han propuesto que las características contráctiles de los músculos son resultado de la suma y/o combinación de las propiedades de contracción de los diferentes tipos de fibras y de la proporción en que están presentes (Pette, et al. 1999).

A partir de lo anterior, podría suponerse que la mayor fuerza (normalizada) generada por los músculos EDL de las ratas macho desnutridos está en relación directa con el incremento en el porcentaje de fibras Tipo IIB. Sin embargo, esta posibilidad no fue estrictamente soportada por nuestra evidencia experimental, debido a que los músculos EDL de los animales desnutridos generan mayor fuerza (normalizada) en el día PN20, mientras que la mayor proporción de fibras Tipo IIB ocurre a en el día PN40. Tal discrepancia temporal podría explicarse si se toma en consideración que la actividad contráctil regula el fenotipo de las fibras durante el desarrollo posnatal de los músculos

(Barnard, et al. 1970; Flück y Hoppeler, 2003). Además, la fuerza (normalizada) generada durante la sacudida simple por los músculos EDL de la pierna derecha prácticamente no mostraron una correlación lineal con la proporción de fibras Tipo IIB establecida en los músculos EDL de la pierna izquierda de la misma rata, sugiriendo que la fuerza (normalizada) de la sacudida simple no se encuentra relacionada directamente con la proporción de fibras Tipo IIB en el músculo EDL de las ratas macho desnutridos.

Para analizar el punto anterior, se obtuvo la relación entre los valores de la fuerza normalizada y la proporción relativa de las fibras IIB en los músculos controles y desnutridos. Se encontró una notable dispersión de los datos, obteniéndose coeficientes de correlación lineal relativamente bajos, tanto para los músculos de animales controles y desnutridos, machos y hembras (R^2 MC = 0.01, y R^2 MD = 0.09, R^2 HC = 0.02, R^2 HD = 0.27 respectivamente). Estos resultados indican que no existe una relación lineal entre el porcentaje de fibras del tipo IIB y la fuerza contráctil de los músculos EDL de las ratas controles y desnutridos, de ambos géneros, y permiten sugerir que la relación entre las proporciones de los tipos distintos tipos de fibras (I, IIA y IIB) y la fuerza normalizada es mucho más compleja y que posiblemente se encuentra influenciada por otros factores, tales como por ejemplo: la proporción de fibras híbridas; cambios en los componentes elásticos de las fibras; el estado del balance redox de las fibras; número de puentes cruzados en estado de unión fuerte (“Strong-Binding”), entre otros (Peuker y Pette, 1997; Stephenson, 2001; Andrade, et al, 2001; Lowe, et al., 2010).

El incremento en la fuerza (normalizada) de la sacudida simple y del tétano generada por los músculos EDL de ratas macho desnutridas pero no en los músculos de los animales hembra desnutridas, podría deberse a que la desnutrición crónica severa provoca alteraciones en diversos procesos celulares aun no bien determinados, más no a la predominancia de fibras Tipo IIB en estados tempranos del desarrollo de la rata. Para explicar el incremento en la fuerza normalizada de los músculos de los machos desnutridos se podría sugerir que la desnutrición provoca una disminución de la actividad de la Ca^{2+} ATPasa (SERCA) en el retículo sarcoplásmico lo que provocaría un incremento en la disponibilidad de Ca^{2+} intrafibra, que podría ser utilizado para aumentar la respuesta contráctil de las fibras del músculo en edades posnatales tempranas, como fue propuesto por Ramirez-Oseguera y colaboradores (2013) en musculos de ratas desnutridas recién nacidas.

Asimismo, se conoce que dietas hipoproteínicas inducen una reducción de antioxidantes, tales como el glutatión, en los músculos rápidos de la rata (Plant, et al.

2001; Akinola, et al. 2010). La exposición de músculos EDL completos y de fibras aisladas de EDL a especies reactivas de oxígeno (ROS) induce un incremento en la fuerza generada durante una contracción isotónica (véase Anexo 1), este aumento de la fuerza fue atribuido por los autores a un incremento en la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico hacia el mioplasma, probablemente asociado con la oxidación del receptor de Dihidropiridina y/o de Rianodina (Oba, et al. 1996; Plant, et al, 2001; Andrade, et al, 2001; Tupling, et al. 2007) y a un incremento en la sensibilidad a los iones calcio por el complejo de la troponina (Lamb y Westerbland, 2011; Posterino, et al. 2003). Además, los ROS inducen una reducción de la actividad de la SERCA del retículo sarcoplásmico (Liu, et al. 2009). Puesto que la desnutrición provoca estrés oxidativo en los músculos, induciendo cambios en los sistemas antioxidantes intracelulares, ello favorece la fosforilación de las cinasas de las cabezas de miosina (S1) y de las cadenas ligeras regulatorias RLC (Andrade, et al., 2001; Murphy, et al. 2008; Muzi-Filho, et al. 2013) lo que podría explicar en parte el incremento en la fuerza de la sacudida simple y de la respuesta tétanica debido a la aproximación de las cabezas de miosina a los filamentos de actina (Prochniewicz, et al. 2008; Murphy, et al. 2008). y/o por un incremento del número de puentes de miosina en configuración de unión fuerte "Strong Binding configuration" (Lowe, et al., 2010). En el caso de los músculos de las hembras, la ausencia de cambios en la fuerza normalizada en la sacudida simple y el tétano y en la proporción relativa de tipos de fibras respecto a los músculos EDL de animales desnutridos y controles podría estar asociada a la acción antioxidante protectora de los estrógenos (Zhang, et al., 2007; Tiidus, 2011), lo cual reduciría las consecuencias del estrés oxidativo provocado en los músculos de las ratas hembra desnutridas.

Por otra parte, se acepta que el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas es influenciado negativamente por la desnutrición durante el desarrollo perinatal (Rhind, et al., 2001). Lo que trae como consecuencia, una reducción en la concentración sérica del estradiol y la testosterona en las ratas macho (Teixeira, et al., 2007) y la inducción de cambios en la proporción relativa de los tipos de fibras en los músculos (Rajikin, 1984; D'Albis y Butler-Brown, 1993). Por ejemplo algunos investigadores han determinado que la testosterona es capaz de incrementar el número de fibras del Tipo II (Holmäng, et al. 1990). A partir de lo anterior y en base a nuestros resultados, proponemos que cambios en la expresión de factores hormonales masculinos, inducidos por la desnutrición crónica, podrían estar involucrados en las alteraciones en la diferenciación de los tipos

de fibras presentes en el músculo EDL de las ratas macho desnutridos. Y por otro lado, que los estrógenos tienen un efecto protector sobre los músculos EDL de ratas hembra desnutridas (Tiidus, 2000; Zhang, et al., 2007), pero el mecanismo involucrado en tales efectos requiere de ser evaluado apropiadamente mediante protocolos experimentales orientados hacia ese propósito, los cuales son ajenos al presente estudio.

10. CONCLUSIONES

- 1) La desnutrición crónica severa (pre y posnatal), provoca alteraciones significativas en el peso corporal y de los músculos de ambos generos, en la composición de los tipos de fibras rápidas y en las propiedades contráctiles de los músculos EDL de ratas macho pero no en las de los músculos de ratas hembra, en distintas edades posnatales.
- 2) Los músculos EDL de las ratas macho son más susceptibles a la restricción alimenticia que los músculos de las ratas hembra durante el desarrollo posnatal.
- 3) La proporción de fuerza desarrollada por los músculos EDL no presenta una relación directa con la predominancia de un tipo específico de fibras, sino más bien, es representativa de una relación más compleja.
- 4) Las fibras rápidas (IIA y IIB) son distinguibles claramente con la técnica de la m-ATPasa ácida (pH= 4.7) de Lind y Kernnell (1991) solo a partir de los 20 días de edad.
- 5) La reducción del peso corporal causada por la restricción alimenticia induce en las ratas hembra y macho desnutridas una reducción en los requerimientos de energía de mantenimiento y de la tasa metabólica basal, sin embargo, en los machos desnutridos esta respuesta es de mayor magnitud y mas duradera que en las hembras desnutridas, lo cual sugiere que las ratas macho desnutridas cronicamente utilizan más eficientemente (ó diferente) el aporte energético de los alimentos.

- 6) La desnutrición crónica severa no altera en número total de fibras del músculo EDL durante el desarrollo posnatal que va de la lactancia al inicio de la vida adulta (20 a 60 días de edad) en ninguno de los dos géneros, pero sí ocurre una reducción significativa del número total de fibras en ratas viejas (de 365 días de edad) de ambos géneros.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidley, D. J., 1978: *The Physiology of Excitable Cells*. 2nd edn. Cambridge University Press, London, England. pp. 223-235.
- D'Albis, A.; Butler-Browne, G., 1993: The hormonal control of myosin isoform expression in skeletal muscle of mammals. A Review. *Basic Applied Myology* 3, 7-16.
- Akinola, F.F.; Oguntibeju, O.O.; Alabi, O.O., 2010: Effects of severe malnutrition on oxidative stress in Wistar rats. *Scientific Research and Essays* 5, 1145-1149.
- Ameredes, B.T.; Watchko, J.F.; Daood, M.J.; Rosas, J.F.; Donahoe, M.P.; Roger, R.M., 1999: Growth hormone improves body mass recovery with refeeding after chronic undernutrition-induced muscle atrophy in aging male rats. *Journal of Nutrition* 129, 2264-2270.
- Andrade, F.H.; Reid, M.B.; Allen, D.G.; Westerblad, H., 1998: Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *Journal of Physiology* 509.2, 565-575.
- Andrade, F.H.; Reid, M.B.; Westerblad, H., 2001: Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. *FASEB Journal* (15), 309-314
- Balice-Gordon, R. J.; Thompson, W.J., 1988: The organization and development of compartmentalized innervations in rat extensor digitorum longus muscle. *Journal of Physiology* 398, 211-231.
- Barnard, R. J.; Edgerton, V.R.; Peter, J.B., 1970: Effect of exercise on skeletal muscle. I. Biochemical and histological properties. *Journal of Applied Physiology* 28, 762-766
- Bassel-Duby, R. y Olson, E.N. 2006: Signaling Pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 19-37
- Blakburn, G.L., 2001: Pasteur Quadrant and malnutrition. *Nature* 409, 397-401.
- Bear, M.F.; Connors, B.W.; Paradiso, M.A., 2001: *Neuroscience: Exploring the brain*, 2nd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, United States of America. 448-450.
- Bedi, K.S., 1994: Undernutrition of rats during early life does not affect the total number of cortical neurones. *Journal of Comparative Neurology*. 324, 596-602.
- Bedi, K.S.; Birzgalis, A.R.; Mahon, R.; Smart, J.L.; Wareham, A.C., 1982: Early life undernutrition in rat. *Br. J. Nutr.* 47, 417-430.
- Berchtold, M.W.; Brinkmeier, H.; y Müntener, M., 2000: Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity and disease. *Physiological Reviews*. 3(80), 1215-1265.
- Biewener, A.A., 2003: *Animal Locomotion*. Oxford New York Oxford Animal Biology. Series Oxford University Press, New York, USA. 1-35.

- Benjamini, Y.; Hochberg, Y., 2000: The adaptive control of the false discovery rate in multiple hypothesis testing. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* 25, 60-83.
- Bissonette, J.D.; Madapallinatam, A.; Jeejeebhoy, K.N., 1997: Effect of hypoenergetic feeding and high carbohydrates refeeding muscle tetanic tension, relaxation rate, and fatigue in slow- and fast twitch muscles in rats. *American Journal of Clinical Nutrition* 66, 293-303.
- Bissonette, J.D.; Jeejeebhoy, K.N., 1998: Feeding a low energy diet and refeeding a control diet affect glycolysis adult male Wistar rats. *Journal Nutrition*. 128, 1723-1730
- Boreham, C.A.G.; Watt, P.W. Williams, P.E.; Merry, B.J.; Goldpink, G. Goldpink, D.F., 1988: Effects of ageing and chronic dietary restriction on the morphology of fast and slow muscles of the rat. *Journal Anat.* 157, 111-125
- Boron, W.F.; Boulpaep, E.L., 2009: *Medical Physiology: A cellular and molecular approach*. 2nd edn. Saunders Elsevier, Canada. 212-251
- Bottinelli, R., 2001: Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibres: do myosin isoforms tell the whole story. *Pflügers Archives*. 443, 6-17.
- Bottinelli, R.; Schiaffino, S.; Reggiani, C., 1991: Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. *Journal of Physiology* 437, 655-672.
- Brameld. J.M.; Buttery, P.J.; Dawson, M.; Harper, M.M., 1998: Nutritional and hormonal control skeletal-muscle cell growth differentiation. *Proceedings of Nutrition Society* 51, 207-217.
- Brameld, J.M., 2004: The influence of undernutrition on skeletal muscle development. *British Journal of Nutrition* 91, 327-328
- Brooke, M.H.; Kaiser, K.K., 1970: Muscle fiber types: how many and what kind. *Archives of Neurology* 23, 369-370.
- Brozanski, B.S.; Daoud, M.J.; Laframboise, W.A. Watcho, J.F.; Foley, Jr. T.P.; Butler-Browne, G.S.; Whalen, R.G.; Guthrie, R.D.; Ontel, M., 1991: Effects of perinatal undernutrition on elimination of immature myosin isoforms in the rat diaphragm. *Am. J. Physiol.* 261, 49-54.
- Brozanski, B.S.; Watchko, J.F.; Terrence, L.O.; Guthrie, D., 1993: Undernutrition effects on contractile and fatigue properties of rat diaphragm during development. *Journal Applied Physiology* 74, 2121-2126.
- Buckingham, M., 1994: *Molecular Biology of muscle development*. Cell. 78, 15-21.
- Burke, R.E.; Levine, D.N.; Sachmann, M.; Tsairis, P., 1974: *Motors units in cat soleus muscle: Physiological, Histochemical and Morphological Characteristics*. *J. Physiol. (Lond)* 238, 503-514.
- Catterall, W.A., 2011: Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Herb Prospect Biol.* 3a003947, 1-23.
- Celichowski, J.; Drzymala, H. 2006: Differences between properties of male and female motor units in the rat medial gastrocnemius muscle. *Journal of Physiology and Pharmacology* 57, 1, 83-93
- Chan, S., and Head, S.I., 2010: Age and gender-related changes in contractile properties of non-atrophied EDL muscle. *Plos One* August 5, (8): e12345.
- Clarke, H. E.; Coates, M. E.; Eva, J. K.; Ford, D. J.; Milner, C. K.; O'Donoghue, P. N.; Scott, P. P.; Ward, R. J., 1977: *Dietary standard for laboratory animals: report of the laboratory animals center diets advisory committee*. *Laboratory Animals*. 11, 1-28.

- Close, R., 1964: Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat during development. *Journal Physiology* 173, 74-95.
- Close, R.; Rhot, J.F., 1972: The hormonal control of myosin isoform expression in skeletal muscle of mammals: A review. *Basic and Applied Myology*. 3, 7-16.
- Cornachione, A.S.; Benedini-Elias, P.C.O.; Polizello, J.C.; Carvalho, L.C.; Mattiello-Sverzut, A.C., 2011: Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats. *Acta Histochemica and Cytochemica* 44, 43-50.
- Cortes Barberena, E.; Gonzalez Marquez, H.; Gómez Olivares, J. L.; Ortiz Muñoz, R., 2008: Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T subsets and activation assessed by flow cytometry. *Clinical and Experimental Immunology*. 152, 585-592.
- Christ, B. y Brand-Saberi, B. 2002: Limb muscle development. *International Journal of Developmental Biology*. 46, 905-914.
- .Daniel, Z.C.; Brameld, J.M.; Craigon, J.; Scollan, N.D.; Buttery, P.J., 2007: Effect of maternal dietary restriction during pregnancy on lamb carcass characteristics and muscle fiber composition. *Journal of Animal Science*. 85, 1565-1576.
- Danieli-Betto, D.; Betto, R.; Megighian, A.; Midrio, M.; Salviati, G.; Larsson, L., 1995: Effects of age on sarcoplasmic reticulum properties and histochemical composition of fast and slow-twitch rat muscles. *Acta Physiologica Scandinavica*. 154, 59-64.
- Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D., 1990: *Molecular Cell Biology*. 2a edn. Scientific American Books, USA. 859-900
- Dermatas, B.; Özcan, M., 2012: The effect of maternal undernutrition on muscle development in the ovine fetus. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science* 36, 1105-1145.
- De-Nardi, C.; Ausoni, S.; Moretti, A.P.; Gorza, L.; Velleca, M.; Buckingham, M.; Schiaffino, S., 1993: Tipe 2X-Myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *The Journal of Cell Biology* 123(4): 823-835.
- De-Nies, M. S.; Johnson, J.; Maliphol, A.B.; Bruno, M.; Abbas Rizvi, Kim, A.; Rizvi, A.; Rustici, K.; Medler, S. 2014. Diet-induced obesity alters skeletal muscle fiber types of male but not female mice. *Physiology Reports*, 2(1): 1-11
- Desay, M.; Crowther, N.J.; Lucas, A.; Hales, C.N., 1996: Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *British Journal of Nutrition* 76, 591-603.
- Dwyer, C.M.; Stickland, N.C.; Fletcher, J.M., 1994: The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *Journal of Animal Science* 72, 3339-3343.
- ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutricion, 2012, Resultados por entidad Federativa, Distrito Federal. Instituto Nacional de Salud Pública. 1ª edición electrónica, 2013. Cuernavaca Morelos, México. Oropeza Abundez, C. (coord.) Edición, Raveles, F (coord.); Produccion Rivero Vazquez, S. (coord.) 63-87
- Elder G.C.B.; McComas A.J. 1987. Development of rat muscle during short and long term hindlimb suspension. *Journal of Applied Physiology*. 62, 1017-1923
- Eppenberger, H.M.; Eppenberger, M; Richtering, R.; Aebi, H., 1964: The ontogeny of creatin kinase isoenzymes. *Developmental Biology*. 10, 1-16.
- Everts, M.E., 1996: Effects of thyroid hormones on contractility and cation transport in skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*. 156, 325-333.
- Fitts, R.H., 2008: The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. *Journal of Applied Physiology*. 104, 551-558.

- Floeter, M.K., 1999: Muscle motors neurons, and motors neurons pools. (chapter 30) En: *Fundamental Neuroscience*. Zigmond, M.J.; Bloom, F.E.; Landis, S.C.; Roberts, J.L.; Squire, L.R. (Eds.). Academic Press, San Diego California, USA. 863-887.
- Flück, M.; Hoppeler, H., 2003: Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Review of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 146, 159-216.
- Franzini Armstrong, C., 1970: Studies of the triad. Structure of the junction in frog twitch fibres. *Journal Cell Biol.* 47. 488-499.
- Ganong, W.F., 1994: *Fisiología Médica*, 14 edn. El Manual Moderno, D.F., México. 67-87.
- Geeves, M.A.; Fedorov, R.; Manstein, D.J., 2005: Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell Mol. Life Sci.* 62:1462-1477.
- Glenmark, B.; Nilsson, M.; Gao, H.; Gustafsson, J.A., 2004: Difference in skeletal muscle function in males vs females role of estrogen receptor- β . *American Journal of Physiology. Endocrinol. Metab.* 287, E1125-E1131.
- Goldspink, G., 1977: The influence of activity on muscle size protein turnover. *Journal of Physiology. (Lond)* 264, 283-296.
- Goldspink, G., 1978: The ATP usage by fast and slow muscle in the maintenance of isometric tension. *Journal of Physiology.* 206, 28-29.
- Goldspink, G.; Ward, P.S., 1979: Changes in rodent muscle fibre types during postnatal growth, undernutrition and exercise. *Journal of Physiology* 296, 453-469.
- Goldspink, G., 1980: Growth of muscle. Society for experimental biology seminar Series. Development and specialization of skeletal muscle. Cambridge Univ. Press, England. 20-25.
- Goldspink, G., 1999: Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and Overload. *Journal Anatomy.* 194, 323-334.
- Gordon, A.M.; Homsher, E.; Regnier, M., 2000: Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiological Reviews* 2(80), 853-924.
- Green, H.J.; Reichmann, H.; Pette, D., 1982: A comparison of two ATPase based schemes for histochemical muscle fibre typing in various mammals. *Histochemistry.* 76, 21-31.
- Guth, L.; Samaha, J.F., 1970: Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. Research note. *Experimental Neurology* 28, 365-367.
- Guyton, A.C.; Hall, J.E.; 2000: *Tratado de Fisiología Médica*. 9rd edn. Interamericana McGraw Hill, D.F. México. 79-101.
- Hall, N.; DeLuca, M., 1975: Developmental changes in creatine phosphokinase isoenzymes in neonatal mouse hearts. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 6, 988-994.
- Hansen, A.K.; Clausen, T.; Nielsen, O.B. 2005: Effects of lactic and catecholamines on contractility in fast-twitch. *American Journal of Physiology. Cell Physiology.* 289, C104-C112.
- Harding, J. E., 2001: The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *International Journal of Epidemiology* 30, 15-23.
- Harrison, A.P.; Tivey, D.R.; Clausen, T.; Duchamp, C.; Dauncey, M.J., 1996: Role of hormones in early postnatal development of skeletal muscle and its implications for undernutrition. *British Journal of Nutrition* 76, 841-855.

- Harridge, S.D.R., 2006: Responses and adaptations of skeletal muscle to hormones and drugs. In Botinelli, R. y Reggiani, C. (ed.), *Skeletal muscle plasticity in health and disease: From genes to whole muscle*. Springer, Vol. 2, 289-314.
- Harris, A.J.; Fitzsimons, R.B.; McEwan, J.C., 1989: Neural control of the sequence of expression of myosin heavy chain isoforms in fetal mammalian muscles. *Development* 170, 751-769.
- Hegarty, P.V.J.; Kim, K.O., 1980: Changes in skeletal muscle in starved and refeed young rats. *British Journal of Nutrition* 44, 123-127.
- Ho, K.W.; Heusner, W.W. Van Huss, Van Huss, W.D., 1983: Postnatal muscle fibre histochemistry in the rat. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 76, 37-49
- Howells, K.F.; Hulme, J.M.L.; Jordan, T.C., 1979: Sex-related differences in the response of fast and slow muscle fibres to early undernutrition. *Research in Experimental Medicine (Berlin)*. 176, 113-137.
- Holmang, A.; Svedberg, J.; Jennische, E.; Bjornorp, P. 1990. Effects of testosterone on muscle insulin sensitivity and morphology in female rats. *American Journal Physiology*. 259, E555-E560.
- Huerta, M.; Muñiz, J.; Gamboa, R. 1986: Contracción muscular. En temas Selectos de Biología Celular. México Dirección de Comunicación Social/ Cosnet/ SEP / Cosnet/ Cinvestav Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias 1-38 .
- Huxley, A.F., 1974: Muscle contraction. Review Lecture. *Journal of Physiology*. 243, 1-43.
- Ihemelandu, E.C., 1981: Comparison of effect of oestrogen on muscle development of male and female mice. *Acta Anat.* 110, 311-317.
- Isayama, N.; Oishi, J.; Alves Cagnon, V.H.; Rocha Campos, G.E., 2006: Effect of testosterone on skeletal muscle of young and old male rats. *Braz. J. Morphol. Sci.* 23 (2), 247-253.
- Kandel, R.E.; Schwartz, H.J.; Jessell, M.T., 1997: Principles of neural science. 3rd edn. chapter 36) . Appleton and Lange Norwalk Ed., Connecticut, USA. 548-570.
- Kelly, A.M.; Zaks, S.I., 1969: The histogenesis of the rat intercostal muscle. *Journal of Cell Biology*. 42, 135-153.
- Keenan, K. P.; Laroque, P.; Ballam, G. C.; Soper, K. A.; Dixit, R.; Mattson, B. A.; Adams, S. P.; Coleman, J. B., 1996: The effects of diet, ad libitum overfeeding, and moderate dietary restriction on the rodent bioassay: the uncontrolled variable in safety assessment. *Toxicologic Pathology* 24, 757-768.
- Kendall, B. y Storn, R. 2002. Review Exercise-Induced Muscle Damage and the Potential Protective Role of Estrogen. *Sport Med.*; 32 (2) 103-119.
- Kernell, D., 1998: Muscle regionalization. *Canadian Journal of Applied Physiology*. 23, 1-22.
- Keynes, P.D. y Aidley, D.J. 1885. *Nerve and Muscle*. Cambridge University Press. New York USA. 103-140.
- Komisaruk, R.B.; Adler, N.T.; Hutchinson, J., 1972: General sensory field: enlargement by estrogen treatment in female rats. *Science* 178, 1295-1298.
- Krisnamurthy, N.; Balakumar, B.; Thombre, D.P. 1992: Effects of undernutrition and sex difference on skeletal muscle function in young rats. *Indian Journal. Physiology Pharmacology*. 36(4), 234-238.
- Kristensen, M.; Albertsen, J.; Rentsch, M.; Juel, C., 2005: Lactate and force production in skeletal muscle. *Journal of Physiology*. 562 (2), 521-526.
- Kugelberg E. 1976. Adaptive transformation of rat soleus motor units during growth. *Journal of the Neurological Sciences* 27, 269-289.

- Lamb, G.D.; Westerblad, H., 2011: Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. *Journal of Physiology* 589, 2119- 2127.
- Layman, D.K.; Swan, B.; Hegarty, P.V.J., 1981: The effect of acute dietary restriction on muscle fibre number in weanling rats. *British Journal of Nutrition* 45, 475-481.
- Lind, A.; Kernell, D., 1991: Myofibrillar ATPase histochemistry of rat skeletal muscles: a two-dimensional quantitative approach. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 39, 589-597.
- Liu, Y. H.; Li, W.; Song, W. H., 2009: Effects of oestrogen on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and gene expression in genioglossus in chronic intermittent hypoxia rats. *Archives of Oral Biology* 54, 322–328.
- López Jiménez, D.; Torrero, C.; Regalado, M.; Salas, M., 2013: Effects of perinatal undernutrition and massage stimulation upon the ambiguous nucleus in the rats prior to weaning. *Journal of Behavioral and Brain Science* 3, 200–209.
- Lowe, D.A.; Thomas, D.D.; and Thompson, L.V., 2002: Force generation, but non myosin ATPase activity, declines with age in rat muscle fiber. *American Journal Physiology. Cell Physiology*. 283, C187-C192.
- Lowe, D. A.; Baltgalvis, K. A.; Greising, S. M., 2010: Mechanisms behind estrogens, effect on muscle strength in females. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 38, 61–67.
- Lucas, A.; Baker, B.A.; Desay, M., Hales, C.N., 1996: Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring. *British Journal of Nutrition* 76, 605-612.
- Mass, H.; Jaspers, R.T.; Baan, G.C.; Huijing, P.A., 2003: Myofascial force transmission between a single muscle head and adjacent tissues; length effects of head III of rat EDL. *Journal of Applied Physiology*. 95, 2004-2013.
- Maltin, Ch. A., 2008: Review, Muscle development and obesity. *Organogenesis* 4.3, 158-169.
- Mattiazzi, R.A., 2000: Músculo esquelético, cardíaco y liso. 7rd edn. (Cap. 4). En: Cingolani, E.H. y Houssay, B.A. (Ed.), *Fisiología Humana*. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 60-93.
- McCarter, R.B.; Yu, P.; Radicke, D., 1978: Effects of caloric restriction on contraction of skeletal muscle. *Nutrition Reports International* 17, 339-345.
- Moran, A.L.; Warren, G.L.; Lowe, D.A., 2006: Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. *Journal of Applied Physiology*. 100, 548-559.
- Morgane, P.J.; Austin-Lafrance, R.J.; Bronzino, J.D.; Tonkiss, J.; Galler, J.R. 1992: Malnutrition and the developing central nervous system. En: Issacson, R.L.; Jensen, K.F. (Ed.). *The Vulnerable Brain and Enviromental Risks*, Vol. 1 *Malnutrition and Hazard Assessment*. Plenum Press, New York. 3-34.
- Morgane, P.J.; Austin-Lafrance, R.J.; Bronzino, J.D.; Tonkiss, J.; Diaz-Cintra, S., Cintra, L.; Kemper, T.; Geller, J.R., 1993: Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience & Biobehavioral. Reviews*. 17, 91-98.
- Morris, G.E.; Piper, M.; Cole, R., 1976: Do increase in enzyme activities during muscle differentiation reflect expression of new genes. *Journal of Cell Biology*. 263, 76-77.
- Murphy, R. M.; Dutka, T. L.; Lamb, G. D., 2008: Hydroxyl radical and glutathione interactions alter calcium sensitivity and maximum force of the contractile apparatus in rat skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology* 586, 2203–2216.

- Muzi Filho, H.; Bezerra, C. G. P.; Sousa, A. M.; Boldrini, L. C.; Takiva, C. M.; Oliveira, F. L.; Nesi, R. T.; Valenca, S. S.; Einicker Lamas, M.; Vieyra, A.; Lara, L. S.; Cunha, V. M. N., 2013: Undernutrition affects cell survival, oxidative stress, Ca²⁺ handling and signaling pathways in Vas Deferens, crippling reproductive capacity. *PLoS ONE* 8, e69682.
- Narici, M., Maganaris, C. 2006: Muscle architecture and adaptations to functional requirements. In Botinelli, R. y Reggiani, C. (ed.), *Skeletal muscle plasticity in health and disease: From genes to whole muscle*. Springer, (2), 289-314.
- National Research Council., 2010: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th edn. The National Academic Press, Washington, DC.
- National Research Council, Subcommittee of Laboratory Animal Nutrition, 1995. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th edn. The National Academic Press, Washington, DC.
- Navarrete, R.; Vrbova, G., 1993: Activity-dependent interactions between motoneurons and muscles: Their role the developing of the until. *Progress in Neurobiology*. 41, 93-124.
- Oba, T.; Koshita, M.; Yamaguchi, M., 1996: H₂O₂ modulates twitch tension and increases P_o of Ca²⁺ release channel in frog skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 271, C810-C818.
- Ordahl, C.P.; Le-Duaring, N.M. 1992: Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* 174, 339-353.
- Padykula, A.H.; Herman, E., 1955: The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphohatase. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 3, 170-195.
- Paine, A.M.; Delboro, O., 2006: Plasticity of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. In Botinelli, R. y Reggiani, C. (ed.), *Skeletal muscle plasticity in health and disease: From genes to whole muscle*. Springer, Vol. 2, 289-314.
- Pereon, Y.; Louboutin, J.P.; Noireaud, J., 1993: Contractile responses in rat extensor digitorum longus muscles at different times of postnatal development. *Journal of Comparative Physiology. B*. 163, 203-211.
- Petter, R.; Vrbova, G., 1985: Invited review: Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle & Nerve* 8, 676-689.
- Pette, D.; Staron, R., 1990: Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*. 116, 1-75.
- Pette, D.; Peuker, H.; Staron, R.S., 1999: The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiologica Scandinavica* 166, 261-277.
- Pette, D.; Staron, R., 2000: Myosin isoform, muscle fiber types, and transitions. *Microscopic Research and Technique* 50, 500-509.
- Pette, D., 2006: Skeletal muscle plasticity – history, facts and concepts. In Botinelli, R. y Reggiani, C. (ed.), *Skeletal muscle plasticity in health and disease: From genes to whole muscle*. Springer, (2), 289-314.
- Perry, S.; Dhoot, G., 1980: Biochemical aspect of muscle development differentiation. En: Goldspink, D. (ed.). *Development and specialization of skeletal muscle*. Cambridge Univ. Press. England. 51-64.
- Pauker, H.; Pette, D. 1997: Quantitative analyses of myosin heavy-chain mRNA and protein isoforms in single fiber reveal a pronounced fiber heterogeneity in normal rabbit muscles. *Eur. J. Biochem.* 247, 30-36.

- Phillips, S. K.; Sanderson, A. G.; Birch, K.; Bruce, S.A.; Woledge, R.C., 1996: Changes in maximal voluntary force of human adductor pollicis muscle during the menstrual cycle *Journal of Physiology*. 496, 551-557.
- Phillips, S.K; Rook, K.M, Siddle N.C. 1993. Muscle weakness in women occurs at all earlier age than in men. But strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clinical Science.*; 84: 95-8
- Philippi, M.; Sillau, H., 1994: Oxidative capacity distribution in skeletal muscle fibers of the rats. *Journal of Experimental Biology*. 189, 1-11.
- Plant, R.D.; Gregorevic, P.; Williams, D.A.; Lynch, G.S., 2001: Redox modulation of maximum force production of fast and slow twitch skeletal muscles of rats and mice. *Journal of Applied Physiology* 90, 832-838.
- Popesko, P.; Rajtová, V.; Horák, J., 1992: Anatomy of the small laboratory animals: rat, mouse and hamster. Vol. 2, Wolfe, London, England.
- Posterino, G.S.; Cellini, M.A.; Lamb, D., 2003: Effects of oxidation and cytosolic redox conditions on excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology* 547.3, 807-823.
- Powers, S.K.; Jackson, M.J., 2008: Exercise-Induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*. 88, 1243-1276.
- Prakash, Y.S.; Fournier, M.; Sieck, G.C., 1993: Effects of prenatal undernutrition on developing rat diaphragm. *Journal of Applied Physiology* 75, 1044-1052.
- Prezant, D.J.; Richner, B.; Aldrich, R.B.; Valentine, D.E. Gentry, E.L. Cahill, J. 1994: Effect of long-term undernutrition on male and female rat diaphragm contractility, fatigue, and fiber types. *Journal of Applied Physiology*. 76(4): 1540-1547.
- Prochniewicz, E.; Lowe, D. A.; Spakowicz, D. J.; Higgins, L.; O'Connor, K.; Thompson, L.; Ferrington, D. A.; Thomas, D. D., 2008: Functional, structural and chemical changes in myosin associated with hydrogen peroxide treatment of skeletal muscle fibers. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 294, C613–C626.
- Quiróz-González, S.; Escartín-Pérez, R.E.; Paz-Bermúdez, F.; Segura-Alegría, B.; Reyes-Legorreta, C.; Guadarrama-Olmos, J.C.; Floran-Garduño, B.; Jiménez-Estrada, I., 2013: Endogenous content and release of [3H]-GABA and [3H]-glutamate in the spinal cord of chronically undernourished rat. *Neurochemical Research* 38, 23–31.
- Ranatunga, K.W., (1982). Temperature-dependence of shortening velocity and rate of isometric tension development in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*. 329, 465- 483.
- Ranatunga, K.W.; Wylie, S.R. 1983: Temperature-dependent transitions in isometric contraction of rats muscle. *Journal physiol*. 339, 87-95
- Randall, D.; Burggren, W.; French, K., 2002: Fisiología animal: Mecanismos y Adaptaciones. 4rd edn. McGraw Hill Interamericana de España Madrid, España. 381-413.
- Rajikin, M.H., 1984: Change of fibre type composition in soleus muscle of male and female rats during postnatal development. *Malaysian Applied. Biology* 2, 109-113.
- Ramirez-Oseguera, R.; Jiménez-Garduño, A.M.; Álvarez-Medina, R.; Heine, K.; Pinzón-Estrada, E.; Torres-Saldaña, I.; Ortega-Aguilar, A., 2013: Gestational undernourishment modifies the composition of skeletal muscle transverse tubule

- membranes and the mechanical properties of muscles in newborn rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 32, 1024-1039.
- Reid, M.B.; Khawli, F.A.; Moody, M.R. 1993. Reactive oxygen in skeletal muscle III. Contractility of unfatigued muscle. *Journal of Applied Physiology*. 75, 1081-1087.
- Rendenbach, D.M.; Bressier, B.H., 1988: Alteration in contractile properties of extensor digitorum longus muscle from C57BL/6J mice following denervation at 1 day of age. *Experimental Neurology*. 100, 542-555.
- Rhind, S.M.; Rael, M.T.; Brooks, A.N., 2001: Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122, 205-214.
- Rodríguez Hernández G. J. M. (2011) Tercer foro del grupo de trabajo en Pobreza Alimentaria de la CNDS en Nutrición. Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán. Situación Nutricional en México.
- Rosenblueth, A.; Alanis, J.; Rubio, R., 1978: A comparative study of the isometric and isotonic contractions of striated muscles. *Archives Int. Physiology and Biochem*. 66, 330-353.
- Rowe, R.W.; Goldspink, G., 1969: Muscle fiber growth in five different muscles in both sexes of mice. *Journal of Anatomy*. 104, 519-530.
- Rubinstein, N.A.; Kelly, A.M., 1981: Development of muscle fiber specialization in the rat hindlimb. *Journal of Cell Biology* 90, 128-144
- Rubtsov, A.M. 2001: Molecular Mechanisms of regulation of the activity of sarcoplasmic Reticulum Ca-release channels (ryanodine receptors), muscle fatigue, and severin's phenomenon. *Biochemistry (Moscow)*, 10(66), 1132-1143.
- Ruiz Rosado, A.; Fernández Valverde, F.; Mariscal Tovar, S.; Hinojosa Rodríguez, C.X.; Hernández Valencia, J.A.; Anzueto Rios, A.; Guadarrama Olmos, J.C.; Segura Alegría, B.; Jiménez Estrada, I., 2013: Histochemical and morphometric analysis of muscle fiber type transformation during the postnatal development of the chronically food-deprived rat. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 61, 372-381.
- Salama, G.; Abramson, J.J.; Pike, G.K. 1992. Sulphydryl reagents trigger Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum of skinned rabbit psoas fibres. *Journal of Physiology*. 454, 389-420
- Sarward, R.; Niclos, B.B.; Rutherford, O. M., 1996. Changes in muscle strength, relaxation rate and fatigability during the human menstrual cycle. *Journal of Physiology*. 493, 267-72.
- Sathishkumar, K.; Elkins, R.; Yallampalli, Yallampalli, Ch., 2008: Protein restriction during pregnancy induces hypertension and impairs endothelium-dependent vascular function in adult female offspring. *Journal of Vascular Research* 46, 229-23
- Schiaffino, S.; Reggiani, C., 2011: Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*. 91, 1447-1531.
- Schiaffino, S.; Reggiani, C., 1996: Molecular diversity of miofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance. *Physiology versus Anatomy*. 76, 371-423.
- Schutt, E.; Linderberg, U., 1993: A new perspective on muscle contraction. *Minireview. Federation of European Biochemical Society* 325, 59-62.
- Segura Alegría, B. 1993: Efecto de la desnutrición neonatal sobre las propiedades funcionales del músculo esquelético de La rata. Tesis de Maestría. Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV. México D.F.

- Sjogaard, G.; Houston, M.E.; Nygaard, E.; Salting, B., 1978: Subgrouping of fast twitch fibres in skeletal muscles of man. *Histochemistry* 58, 79-87.
- Smart, J.L.; Dobbing, J.; Adlar, B.P.; Lynch, A.; Sand, J., 1973: Vulnerability of developing brain. Relative effect of growth restriction during fetal and suckling periods on behavior and brain composition of adult rats. *Journal Nutrition* 103, 1327-1338.
- Smart, J.L.; Bedi, K.S., 1982. Early life undernutrition in rats. *British Journal Nutrition* 47, 439-444.
- Sousa Melo, D.; Regina Riul, T.; Adriana Esteves, E.; Lanza Moraes, P.; Oliveira Ferreira, F.; Gavioli, M.; Netto Magalhaes Alves, M.; Machado Almeida, P.W.; Guatimosim, S.; Jose Ferreira, A.; Dias Peixoto, M. F., 2013: Effects of severe caloric restriction from birth on the hearts of adult rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 38, 879–885.
- Squire, J., 1981: The structural basis of muscular contraction. Plenum Press, New York, USA. 1-389.
- Stephenson, M.M.G., 2001: Hybrid skeletal muscle fibres: A rare or common phenomenon. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 28, 692-702.
- Stevens, et al. 2006: Muscle plasticity and variation in myofibrillar protein composition of mammalian muscle fiber. In Botinelli, R. y Reggiani, C. (ed.), *Skeletal muscle plasticity in health and disease: From genes to whole muscle*. Springer Vol. 2, 289-314.
- Stickland, N.C.; Widdowson, M.E.; Goldspink, G., 1975: Effects of severe energy and protein deficiencies on the fibres and nuclei skeletal muscle of pigs. *British Journal Nutrition* 34, 421-428.
- Stupka, N. Lowther, S.Chorneyka K. 2000. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *Journal Applied Physiology* 89: 2325-32.
- Tamaki, T.; Uchiyama, S., 1995: Absolute and relative growth of rat skeletal muscle. *Physiology and Behavior* 57 (5), 913-919.
- Takekura, H.; Kasuga, N.; Yoshioka, T., 1994: Differences in ultrastructural and metabolic profiles within the same type of fibres in various muscles of young and adult rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 150, 335-344.
- Teixeira, C.V.; Silandre, D.; De Souza Santos, A.M.; Delalande, C.; Sampaio, F.J.B.; Carreau, S.; da Fonte Ramos, C., 2007: Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *Journal of Endocrinology* 192, 301-311.
- Tiidus, A. E.; 2011. Estrogen and gender effects on muscle damage, inflammation and oxidative stress. *Canadian Journal of Applied Physiology*. 25, 274-287.
- Toscano, A.E.; Manhaes-de-Castro, R.; Canon, F., 2008: Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition* 24, 270-278.
- Tupling, A.R.; Vigna, C.; Ford, R.J.; Tesuchiya, S.C.; Graham, D.A. Denniss, S.G. Rush, J.W.E. 2007: Effects of buthionine sulfoximine treatment on diaphragm contractility. *Journal Applied Physiology*. 103, 1921-1928.
- Vanswearingen, J.M.; Lance-Jones, C. 1995: Slow and fast muscle fiber and preferentially derived from myoblasts migrating into the chick limb bud different developmental times. *Developmental Biology*. 170, 321-337.
- Virgen Ortíz, A., 2002: Efecto del entrenamiento de velocidad sobre las propiedades contráctiles del músculo esquelético de rata sometido a contracciones excéntricas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias fisiológicas con

- especialidad en fisiología. Facultad de Medicina, Universidad de Colima México. 11-26
- Wallimann, T.; Wyss, M.; Brdzcza, P.; Nicolay, K.; Eppenberger, H.M., 1992: Intracellular compartmentation structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: The phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Biochemical Journal*. 281, 21-40.
- Wang, L.; Kernell, D., 2001: Proximo-distal organization and fiber type regionalization in rat hindlimbs muscles. *Journal Muscle Research and Cell Motility* 21, 587-598.
- Ward, S.; Stickland, N., 1993: The effect of undernutrition in early postnatal period on skeletal muscle tissue. *British Journal of Nutrition* 69, 141-150.
- Ward C.W.; Glenn W.; Kerrick L.; Williams J.H. 2004. Ca²⁺ activation of force and actomyosin ATPase activity in skinned muscle fibers: Effects of [MgATP] and temperature. *Basic and Applied Myology* 14 (5), 277-283.
- Wareham, A.C.; Mahon, M; Bedi, K.S; Smart, J.L., 1982: Early life undernutrition in rats. 2. Some contractile properties of skeletal muscles from adult animals. *British Journal of Nutrition* 47, 433-437.
- White, P.; Cattaneo, D.; Dauncey, M.J., 2000: Postnatal regulation of myosin heavy chain isoform expression and metabolic enzyme activity by nutrition. *British Journal of Nutrition* 84, 185-94.
- Wilson, S.J.; Ross, J.J.; Harris, A.J., 1988: A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. *Development*. 102, 815-821.
- Wolfe, R.R., 2006: The underappreciated role of muscle in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. 3,(84), 475-482.
- Winick, M.; Noble, A., 1966: Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *Journal Nutrition*. 89, 300-306.
- Yamaguchi, A.; Horio, Y.; Sakuma, k.; y Katsuta, S., 1993: The effect of nutrition on he size and proportion of muscle fibre types during growth. *Journal Anatomy* 182, 29-36.
- Yoshioca, M.; Boivin, A.; Bulduc, C.; St-Amand, J., 2007: Gender difference of androgen action on skeletal muscle transcriptome. *Journal of Molecular Endocrinology* 39, 119-133.
- Zambrano, E.; Martinez Samayoa, P.M.; Bautista, C.J.; Deas, M.; Gillen, L.; Rodriguez, G.L.; Guzman, C.; Larrea, F.; Nathanielsz, P.W. 2005. Sex differences in transgenerational alteration of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *Journal of Physiology*. 566.1 225-236.
- Zambrano, E.; Bautista, C.J.; Deás, M.; Martínez-Samayoa, P.M.; González-Zamorano, M.; Ledesma, H.; Morales, J.; Larrea, F.; Nathanielsz, P.W., 2006: A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *Journal of Physiology*. 571.1, 221-230.
- Zhu, M.J.; Ford, S.P.; Means, W.J.; Hess, B.W.; Nathanielsz, P.W.; Du, M., 2006: Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *Journal of Physiology*. 575, 241-250.

12. PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS

12.1. Artículo Original

Pereyra-Venegas, J.; Segura-Alegría, B.; Guadarrama-Olmos, J.C.; Mariscal-Tovar, S.; Quiróz-González, S.; Jimenez-Estrada, I., 2014: Effects provoked by chronic undernourishment on the fibre type composition and contractility of fast muscles in male and female developing rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **99** (2015) 974-986 (DOI:10.1111/jpn.12274).

12.2. Presentacion en Congreso

LIV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS León, Guanajuato, (10 al 14 de septiembre), 2011. Sede: Poliforum León. Presentacion Oral: miércoles 14 de septiembre. **Pereyra-Venegas, J.;** Guadarrama-Olmos, J.C.; Segura-Alegría, B.; Jiménez-Estrada, I. Efecto diferencial de la desnutrición crónica sobre la respuesta contráctil de musculos rapidos de ratas hembras y macho durante el desarrollo posnatal (Número de presentación O-90. Hora 10:00 AM)

13. ANEXOS

13.1. Anexo 1. La desnutrición y el balance Redox en los músculos esqueléticos

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o de nitrógeno (ERN) son reguladores importantes de muchos procesos fisiológicos en el músculo esquelético y en otros tejidos. La homeostasis redox de los músculos esqueléticos se mantiene por un balance entre la producción de ERO y las moléculas amortiguadoras producidas por los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos (sistema glutatión-peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, etc.) como no enzimáticos del músculo. Cuando se rompe este balance y se incrementan las ERO se provoca estrés oxidativo, el cual es capaz de alterar la función contráctil del músculo. (Andrade, et al. 1998, 2001). Es bien conocido que la oxidación de los músculos esqueléticos dentro de un estrecho rango regulatorio, es capaz de aumentar la fuerza isométrica. Por ejemplo, el tratamiento durante 10 días con Butionina sulfoximina (BSO 20mM) da como resultado un incremento en la fuerza de la sacudida simple del músculo del diafragma de la rata (Tupling, et al. 2007). Sin embargo, dicho efecto puede ser revertido de manera dosis-dependiente, llegando incluso a inhibirse la generación de fuerza (efecto bifásico de las ERO). El incremento de fuerza provocado por las ERO ha sido explicado por algunos investigadores mediante experimentos que muestran que los ERO inducen la activación del canal de liberación de Ca^{2+} (RyR) del retículo sarcoplásmico y/o por la inhibición de las SERCAs (ATPasas- Ca^{2+}), en ambos casos se produce un incremento en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo cual explicaría el aumento de la fuerza desarrollada por el aparato contráctil del músculo (Tupling, et al. 2007; Ramirez-Oseguera, et al. 2013).

Otros experimentos interesantes han demostrado, que la exposición de fibras musculares (únicas) del músculo flexor brevis de ratones a H_2O_2 (300 μM), provoca una reducción tanto de la fuerza tetánica submáxima (50Hz) como de la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$; tal reducción puede ser revertida por la exposición de las fibras musculares a un agente reductor como el ditioneitol (DTT 1 mM). Estos resultados sugieren que el acoplamiento-excitación-contracción en el músculo esquelético, es mediado por cambios en el estado redox del canal de liberación de Ca^{2+} del RS y/o del sensor de voltaje del músculo, el DHPR (Reid, et al. 1993; Salama, et al. 1992). Existen estudios

que muestran que la variación de la fuerza en las fibras del músculo esquelético pudiera ser mediado por cambios en la sensibilidad miofibrilar al Ca^{2+} (Andrade, et al. 1998), más que a cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Asimismo, estos autores mostraron que el tiempo de exposición a un agente oxidante también es un factor capaz de modificar la respuesta contráctil de las fibras musculares, por ejemplo, la exposición breve de fibras únicas del músculo flexor brevis de ratón a H_2O_2 (150 μM por 3 min) incrementa la fuerza de la contracción tetánica submáxima (40Hz), pero la exposición prolongada (8 min) provoca una disminución en la fuerza de la contracción tetánica submáxima. También resulta de interés que en ninguno de los dos casos, la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue modificada, lo que sugiere que los elementos de la maquinaria contráctil del músculo responden de manera diferencial a los cambios en el balance oxidación-reducción y que la sensibilidad miofibrilar al Ca^{2+} parece ser muy afectada por variaciones en el balance redox, mientras que el canal del retículo sarcoplásmico resulta ser poco sensible a las variaciones del estado redox de las fibras musculares (Andrade, et al. 1998).

Por otro lado, otros investigadores han mostrado que cuando se someten fibras musculares únicas y/o músculos aislados de ratas con alimentación normal a agentes oxidantes se producen daños oxidativos en diversas moléculas, tales como la alquilación de algunos grupos sulfhídrico de la molécula de miosina, así como un incremento del estado de oxidación de los residuos de cisteína de las bombas de Ca^{2+} (SERCA), lo que produce un cierto grado de inhibición de éstas y daños en las cadenas ligeras reguladoras de miosina (Tupling, et al. 2007; Andrade, et al. 1998; Plant, et al. 2001).

En este contexto, es conocido que las dietas hipoproteínicas provocan la reducción de los sistemas antioxidantes, como el sistema glutatión-peroxidasa, en los músculos esqueléticos de ratas y ratones (Akinola, et al. 2010; Plant, et al. 2001), lo que eventualmente podría conducir a la pérdida de la homeostasis redox de este tejido y permitiría la posibilidad de que se presenten alteraciones en la función contráctil del músculo relacionadas con la desnutrición o malnutrición.

13.2. Anexo 2. Características del músculo *Extensor Digitorum Longus* (EDL)

El músculo extensor digitorum longus (EDL), es el músculo extensor de los dedos de la extremidades posteriores de las ratas y otros mamíferos, es un músculo pinado, fusiforme, frecuentemente utilizado como representativo de un músculo de sacudida rápida (Rosenblueth, et al. 1978; Wareham, et al. 1982). Su aporte sanguíneo

proviene principalmente de la arteria tibial anterior ([Balice-Gordon y Thompson, 1988](#)) y su inervación nerviosa (motora) proviene del nervio EDL, una rama del nervio peroneal común. Justo a su entrada al músculo, el nervio EDL se bifurca en dos ramas extramusculares primarias, la rama más cercana al tendón proximal del músculo recibe el nombre de rama K (porque entra al músculo cerca de la rodilla, "Knee") la cual inerva aproximadamente la mitad las fibras antero-mediales del músculo. La segunda rama del nervio EDL, entra por la superficie posterior del músculo, en posición más distal (es designada como rama F por entrar cerca del pie, "foot") e inerva aproximadamente la otra mitad de fibras musculares localizadas en la región posterolateral del músculo. Este tipo de inervación bipartita permite considerar al EDL como un músculo compartimentalizado (anatómicamente un compartimiento neuromuscular es definido como un grupo continuo de fibras musculares y receptores que son inervados por la rama de un nervio). Los axones eferentes del nervio EDL provienen de motoneuronas localizadas en los segmentos L4, L5 y S1 de la médula espinal.

Se ha sugerido que los patrones de compartimentalización de los músculos surgen durante el período embrionario, cuando las fibras musculares están inervadas por varias motoneuronas (inervación poli-neuronal), pero que durante el periodo posnatal temprano la inervación poli-neural es gradualmente reducida y sustituida por una inervación mono-neuronal proceso comúnmente referido como eliminación de sinapsis.

Utilizando el método de depleción de glucógeno, ([Balice-Gordon y Thompson, 1988](#)), establecieron que el territorio inervado por la rama K, contiene un promedio de 67% de fibras lentas, mientras que, el compartimiento inervado por la rama F, contiene el remanente de fibras lentas. Sin embargo, en el caso de las fibras rápidas no se pudo establecer una diferencia marcada en los dos compartimientos.

Estructuralmente el músculo EDL, está conformado por 4 fascículos (II, III, IV y V) separados por tejido conectivo (Figura 18, anexo 2). En su parte proximal, los fascículos de fibras musculares en los fascículos se insertan en la aponeurosis de un tendón común (cuyo origen es el epicóndilo lateral del fémur), mientras que, en su parte distal, se insertan en la aponeurosis de 4 tendones diferentes, los cuales pasan por debajo del ligamento anular y calcáneo y finalmente se insertan distalmente en las falanges de los dedos 2º, 3º, 4º y 5º de la pata de la rata.

El volumen de cada uno de los 4 fascículos del músculo es heterogéneo y contribuye en proporción diferente al área de sección transversal del músculo, por

ejemplo, el área de sección transversal fisiológica del fascículo "V" del EDL (normalizada para el área de sección transversal del músculo completo), fue estimada en $45 \pm 0.6\%$, mientras que el área de los fascículos II, III y IV representan; el $20 \pm 1.4\%$, el $16 \pm 2.2\%$ y el $19 \pm 1.8\%$ respectivamente (Mass, et al. 2003).

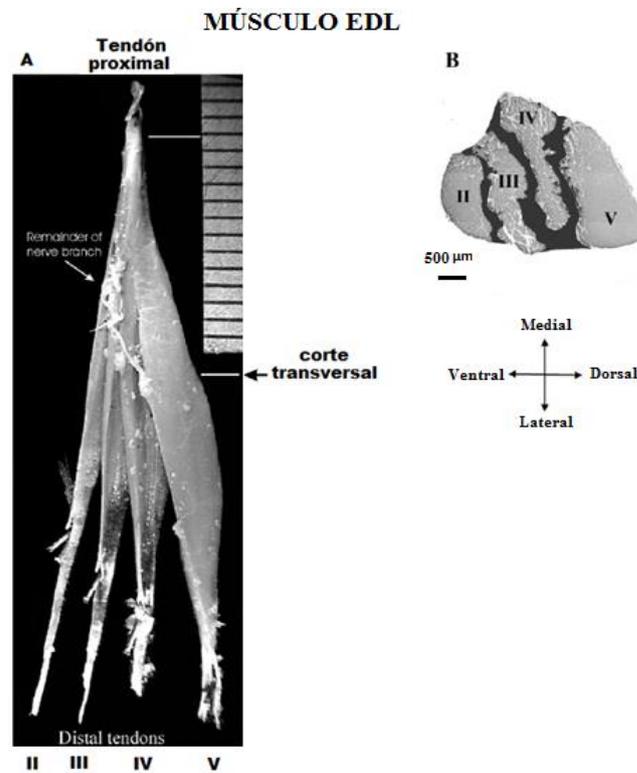


Figura 18: Panel A, los 4 fascículos de fibras musculares (II, III, IV y V) que forman al músculo EDL. En el panel B, se observa el área de sección transversal ocupada por cada fascículo de fibras, note la predominancia del fascículo V que ocupa el $45 \pm 0.6\%$ del área total del EDL. (Modificado de Mass, et al. 2003).

13. 3. Anexo 3. Tabla 8. Composición química del alimento consumido por los animales (Formulab 5008, Lab Diet, Framingham, MA. USA)

Nutrientes:		Minerales		Vitaminas			
Proteína %	23.50	Grasa (ether extract), %	6.50	Ceniza (Ash), %	6.80	Caroteno, ppm	4.00
Arginina	1.44	Grasa (hidrólisis ácida), %	7.50	Calcio, %	1.00	Vit. K (menadiona), ppm	3.2
Cisteína	0.35	Colesterol, ppm	280.0	fosforo, %	0.65	Tiamina (Hidrocloruro) ppm	16.00
Glicina	1.23	A. Linoleico, %	1.37	Fosforo		Riboflavina, ppm	5.00
Histidina	0.58	A. Linolenico, %	0.09	(no fitato) %	0.42	Niacina, ppm	109.00
Isoleucina	1.20	A. araquidónico, %	0.01	Potasio, %	1.10	A. Pantotenico, ppm	15
Leucina	1.87	ácidos grasos Omega-3, %	0.29	Magnesio%	0.20	Cloruro de Colina, ppm	2000.00
Lisina	1.40	Total a. grasos saturados, %	2.51	Sulfuro, %	0.24	Acido fólico, ppm	3.0
Metionina	0.43	Total ácidos grasos,		Sodio, %	0.28	Piridoxina, ppm	6.0
Fenilalanina	1.08	(mono-saturados), %	2.32	Cloruro, %	0.48	Biotina, ppm	0.20
Tirosina	0.66	Fibra (cruda), %	2.32	Fluorina, ppm	19	Vitamina B ₁₂ mcg/gm	20
Treonina	0.90	Fibra (deterg. Neutro), %	19.00	Fierro, ppm	230	Vitamina A, IU/g	15.00
Triptófano	0.28	Fibra (deterg. Ácido), %	11.3	Zinc, ppm	73.00	Vitamina D (added), IU/g	3.30
Valina	1.19	Extracto libre de nitrógeno		Manganeso ppm	71.00	Vitamina E IU/kg	55
Serina	1.20	(por diferencia), %	49.40	Cobre, ppm	13	Acido ascórbico	----
A aspártico	2.60	Almidón, %	34.90	Cobalto, ppm	0.40		
A Glutámico	4.77	Glucosa, %	0.22	Yodo, ppm	1.40		
Alanina	1.39	Fructosa, %	0.24	Selenio, ppm	0.23		
Prolina	1.63	Sucrosa, %	2.57				
Taurina	0.02	Lactosa, %	0.39				

Nutrientes digeribles totales, %: 81.2; Energía gruesa, kcal/g 4.15; Valor de combustible fisiológico, kcal/g 3.50; Energía metabolizarle, kcal/g 3.31. Calorías aportadas por: Proteína, %: 26.849; grasa (extracto de éter), %: 16.71; Carbohidratos, %: 56.44

13.4. Anexo 4: Relacion de figuras y tablas

Figura 1.- Ultraestructura de una miofibrilla.	7
Figura 2.- La miogénesis primaria y secundaria.	16
Figura 3.- Proceso de diferenciación de las fibras musculares.	17
Figura 4.- Los elementos de una triada.	20
Figura 5.- La arquitectura del receptor de hidropiridina (DHPR).	22
Figura 6.- Las fibras musculares y el deslizamiento de los filamentos.	25
Figura 7.- Las fases del ciclo de los puentes cruzados en el músculo esquelético.	27
Figura 8.- Los componentes contráctil y elástico del músculo esquelético.	28
Figura 9.- Fotomicrografía de un músculo EDL con tinción de mATPasa.	47
Figura 10.- Grafica de peso corporal de ratas MC, MD, HC y HD.	50
Figura 11.- Grafico del peso del EDL de las ratas MC, MD, HC, HD.	51
Figura 12.- Grafica de energía de mantenimiento de ratas macho y hembras.	52
Figura 13.- Grafica de la tasa metabólica basal de ratas MC, MD, HC y HD.	52
Figura 14.- Grafica de proporción de fibras IIB / IIA del musculo EDL.	54
Figura 15.- Grafica del área transversal de las fibras tipo I, IIA y IIB.	59
Figura 16.- Registros de la sacudida simple del EDL	62
Figura 17.- Grafica de la fuerza de la sacudida simple del EDL.	63
Figura 18.- El musculo EDL, sus 4 fasciculos y su área transversal.	89
Tabla 1.- Principales isoformas de cadenas pesadas de miosina (MHC).	9
Tabla 2.- Propiedades diferenciales de las fibras fásicas.	11
Tabla 3.- Algunos factores que modifica la fuerza de la contracción muscular.	31
Tabla 4A.- Peso corporal e ingreso de energía en ratas hembra.	55
Tabla 4B.- Peso corporal e ingreso de energía en ratas macho.	56
Tabla 5A.- Número y porcentaje de tipos de fibras en el EDL de ratas hembra.	57
Tabla 5B.- Número y porcentaje de tipos de fibras en el EDL de ratas macho.	58
Tabla 6.- Área de sección transversal total ocupada por las fibras en el EDL.	61
Tabla 7A.- Características contráctiles del músculo EDL de ratas hembra.	64
Tabla 7B.- Características contráctiles del músculo EDL de ratas macho	65
Tabla 8.- Composición química del alimento formulab 5008.	90

