



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

**CAMBIOS MORFOLÓGICOS, HISTOQUÍMICOS Y MIO-MECÁNICOS EN EL
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES EN MODELOS DE INMOVILIZACIÓN
Y ENTRENAMIENTO MUSCULAR**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:
GEOVANNY SANTIAGO YÉPEZ YÁNEZ

TUTORA PRINCIPAL
DRA. KARLA PAOLA GARCÍA PELAGIO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. MARÍA ESTER BRANDA SIQUÉS
INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM
DR. SARAEL ALCAUTER SOLÓRZANO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
DRA. LÍZBETH ROSSANA AYALA DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora principal la Dra. Karla Paola García Pelagio, por su paciencia, dedicación y apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los miembros de mi comité tutor la Dra. María Ester Brandan Siqués, el Dr. Sarel Alcauter Solórzano y la Dra. Lízbeth Rossana Ayala Domínguez, por sus comentarios y orientación durante la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT), por la beca otorgada durante todo el curso de la Maestría en Ciencias (Física Médica).

Este trabajo fue parcialmente apoyado por CONAHCYT (A1-S-17636) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM, IN-217922) por medio de la Dra. Karla Paola García Pelagio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de ingresar al Programa de Posgrado en Ciencias Físicas y por su alto nivel académico.

Al Posgrado en Ciencias Físicas de la UNAM, así como a su personal administrativo, por su disposición y amabilidad al brindar orientación y apoyo en la resolución de inquietudes e inconvenientes durante la maestría.

Al personal académico de la maestría en Física Médica, por compartir sus conocimientos y experiencias durante las clases.

Al Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por proveer los especímenes necesarios para esta investigación, así como a su personal encargado el M. en C. Christian Alan Cabello Hernández y el Blgo. Armando Rodríguez Velasco, por su amabilidad y disposición en la entrega y cuidado de los animales.

A los miembros del Laboratorio de Mecanobiología del Músculo de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo: Lcda. Andrea González Isidoro, M. en C. Manuel Silva Hernández, Lcda. Berenice Anahí Martínez Gutiérrez y José Samuel Rodríguez Olguin. Especialmente a Andrea por su ayuda incondicional en la realización de todos los experimentos.

A los sinodales miembros del jurado la Dra Bertha Segura Alegría, el Dr. Arturo Avendaño Estrada, el Dr. Ismael Jiménez Estrada y la Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez, por revisar de manera crítica y minuciosa el trabajo escrito para su aprobación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, por llenar mi vida de oportunidades y personas maravillosas, ya que sin ellas no habría sido posible este logro.

A mis padres Xavier y Bertha, por las enseñanzas que me dan todos los días de mi vida. De manera especial a mi mamá, por todo el amor, el ejemplo y la abnegación brindadas a la familia; todos los días me siento orgulloso de ser su hijo.

A mis hermanas Karol Ann y Ana Belén, y a mi sobrino Jorge Luis, por todas las risas, los llantos, las alegrías y las tristezas compartidas, especialmente estos años en México.

A la familia Rodas Merchán: Mayra Rodas, Katherine Merchán, Fernando Rodas, Jonnathan Rodas, Dora Merchán, Rómulo Merchán, Charito Merchán y Josefina Merchán. Por tratarme como un miembro de su familia, brindarme la ayuda necesaria para ingresar a la maestría y depositar su confianza en mí.

A mis tías Zoila Yáñez y Ana Rosa Yáñez, por apoyarme desde el inicio de la maestría y por siempre estar pendientes del bienestar de mi familia.

A Mayra, por todo el tiempo que me dió su amor, cuidados y compañía, gracias a su sacrificio fue posible culminar este proceso de formación académica.

A mi amiga Andrea, por darme amor, compañía y cariño desde el primer día que fuimos amigos y por su ayuda incondicional en el desarrollo de este proyecto.

A Don Marcelo Jurado y Doña Gilma Corella, por tratarme como un hijo desde que era un niño y por siempre estar presentes durante estos años de estudio.

A mis amigos Diego y Cristian, por siempre estar presentes en todos los momentos importantes de mi vida y por ser como mis hermanos durante tantos años.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Tony, Fer, Mau, Claudio, Moi, Miriam, Erick, Irene, Ana y Jaz. Por ser excelentes personas y hacerme sentir como en casa. Especialmente a Tony y Fer, por todas las vivencias compartidas y por siempre estar en desacuerdo conmigo, deseo que alcancen el mayor de los éxitos en sus vidas.

A todos los animales de laboratorio, porque son seres inocentes que sufren el más grande de los sacrificios en nombre de la ciencia.

Contenidos

Resumen	VI
Abstract	VIII
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	4
1.2. Planteamiento del problema	6
1.3. Justificación	7
1.4. Hipótesis	8
1.5. Objetivos	8
1.5.1. Objetivo general	8
1.5.2. Objetivos específicos	8
1.6. Estructura del trabajo	9
2. Marco Teórico	11
2.1. Generalidades del músculo esquelético	11
2.1.1. Estructura del músculo esquelético	11
2.1.2. Ultraestructura muscular	13
2.1.2.1. Sarcolema y túbulos transversales	13
2.1.2.2. Retículo sarcoplasmático	14
2.1.2.3. Miofibrilla y sarcómero	15
2.1.2.4. Filamentos de miosina	17
2.1.2.5. Filamentos de actina	18
2.1.3. Unión neuromuscular	19
2.1.4. Excitación y contracción muscular	21
2.1.4.1. Teoría de puentes cruzados	21

2.1.4.2.	Mecánica de la fibra muscular	23
2.1.5.	Tipos de fibras musculares	27
2.1.5.1.	Fibras lentas (tipo I)	28
2.1.5.2.	Fibras rápidas (tipo II)	29
2.2.	Músculo en condiciones especiales	29
2.2.1.	Entrenamiento muscular	29
2.2.1.1.	Entrenamiento por intervalos de alta intensidad	30
2.2.2.	Atrofia por inmovilización	32
2.3.	Ratones de laboratorio C57BL/6J	34
2.3.1.	Características fisiológicas y conductuales	34
2.3.2.	Anatomía del miembro posterior y arquitectura muscular	35
2.3.2.1.	Músculo <i>rectus femoris</i>	36
2.3.2.2.	Músculo <i>soleus</i>	37
2.4.	Técnicas para el estudio de músculo esquelético	37
2.4.1.	Registros mecánicos del músculo esquelético	37
2.4.1.1.	Contracciones isotónicas vs contracciones isométricas	38
2.4.1.2.	Sumación, tetanización y fatiga muscular en los registros mecánicos	40
2.4.2.	Tinciones histológicas e histoquímicas del músculo esquelético	40
2.4.2.1.	Hematoxilina y eosina	41
2.4.2.2.	Nicotinamida Adenina Dinucleótido-Tetrazolio Reductasa Reducida	41
2.4.2.3.	Tricromía de Masson	42
3.	Metodología	44
3.1.	Animales	44
3.2.	Modelos experimentales	45
3.2.1.	Entrenamiento HIIT de resistencia	45
3.2.2.	Inmovilización	47
3.3.	Registros mio-mecánicos	48
3.3.1.	Disección de los músculos <i>rectus femoris</i> y <i>soleus</i> de ratón	48
3.3.2.	Montaje del <i>rectus femoris</i> y <i>soleus</i> de ratón en el miógrafo	49
3.3.3.	Protocolo de estimulación para registros mio-mecánicos	51
3.3.3.1.	Estímulo de contracción	51

3.3.3.2.	Frecuencias del protocolo de estimulación	51
3.3.3.3.	Recopilación de datos al final del protocolo de estimulación	52
3.4.	Tinciones histológicas e histoquímicas	54
3.4.1.	Disección y preparación de las muestras musculares	54
3.4.2.	Cortes histológicos	55
3.4.3.	Protocolos de tinción	55
3.4.3.1.	Tinción H&E	55
3.4.3.2.	Tinción NADH-TR	57
3.4.3.3.	Tinción Tricromía de Masson	59
3.4.4.	Recolección de datos a partir de los cortes histológicos	61
3.5.	Análisis estadístico	63
4.	Resultados y discusión	64
4.1.	Animales	64
4.1.1.	Ingesta de alimentos y líquidos	64
4.1.2.	Peso corporal y parámetros morfométricos	66
4.2.	Registros mio-mecánicos	71
4.3.	Tinciones histológicas e histoquímicas	78
4.4.	Discusión	82
5.	Conclusiones	93
	Referencias	95
A.	Pesos y parámetros morfométricos	111
A.1.	Evolución temporal de los pesos corporales	111
A.2.	Evolución de los parámetros morfométricos	113

Resumen

Introducción: Los músculos esqueléticos tienen una gran capacidad para adaptarse a diversas condiciones experimentales, modificando su estructura y microambiente celular en respuesta a cambios en la actividad muscular. En este trabajo, se examina los cambios morfológicos, histoquímicos y mio-mecánicos experimentados por los músculos esqueléticos de ratones sometidos a inmovilización o entrenamiento de resistencia en intervalos de alta intensidad (HIIT).

Objetivo: Determinar los cambios morfológicos, histoquímicos y mio-mecánicos en el músculo esquelético de ratones sometidos a inmovilización o entrenamiento de resistencia en intervalos de alta intensidad (HIIT).

Metodología: Un grupo de 21 ratones hembra C57BL/6J de diez semanas de edad se dividió en tres subgrupos: HIIT (E, n = 7), inmovilización (I, n = 7) y control (C, n = 7). El protocolo HIIT tuvo una duración de 10 minutos y se dividió en tres etapas: una fase de calentamiento de 3 minutos (12 m/min), tres series alternas de aumento de velocidad (20 m/min) y descanso activo (12 m/min) de duración de un minuto cada una, y una fase de velocidad máxima durante un minuto (28 m/min) realizada en una cinta caminadora con un ángulo de 26°. El HIIT se realizó 5 días a la semana durante 1 mes. La inmovilización duró 21 días y se realizó desde la articulación de la cadera hasta la región metatarsiana en posición de flexión plantar completa con la extremidad trasera completamente extendida usando cinta deportiva de algodón y cinta adhesiva para fijar la extremidad trasera derecha de cada ratón. Los cambios funcionales e histológicos se determinaron mediante registros mio-mecánicos, y tinciones H&E, NADH-TR y tricromía de Masson en los músculos *rectus femoris* (RF, glucolítico rápido) y *soleus* (SOL, oxidativo lento).

Resultados: Experimentos HIIT. En el músculo RF hubo una reducción del 23.7% ($p = 9.0 \times 10^{-4}$) en los diámetros de las fibras, un incremento de 1.7 veces en los núcleos concéntricos y un tiempo de fatiga un 27.7% más prolongado que el grupo control. En el

músculo SOL los diámetros de las fibras fueron un 22.7 % ($p = 6.5 \times 10^{-5}$) más pequeños y la cantidad de núcleos concéntricos fue 2.2 veces mayor ($p = 0.001$) en comparación con el control, mientras que el tiempo de fatiga fue un 35.6 % más grande. No se observaron cambios significativos en los porcentajes de fibras tipo I y tipo II respecto al control. Hubo una menor presencia de fibras tipo II en el RF, un 63.8 % frente a un 66.4 % respecto al control, y una menor presencia de fibras tipo I en el SOL, un 72.6 % comparado con el 74.1 % en el control. El músculo RF mostró una mayor presencia de colágeno respecto al control, mientras que el músculo SOL presentó una menor presencia de colágeno comparada con el control. La tensión tetánica por área de sección transversal (CSA) del RF fue un 10.3 % menor que el control, mientras que la fuerza tetánica por CSA del SOL superó al control en un 31.4 % ($p = 0.003$). No se encontraron diferencias significativas entre las fuerzas específicas, sin embargo, las diferencias porcentuales máximas para los músculos RF y SOL fueron del 12.5 % y el 55.9 %, respectivamente.

Experimentos de inmovilización. En el músculo RF el diámetro de las fibras mostró una reducción del 40.7 % ($p = 3.2 \times 10^{-6}$), un incremento de 4.1 veces en los núcleos concéntricos ($p = 8.8 \times 10^{-5}$) y una disminución del 0.9 % en el tiempo de fatiga. Para el músculo SOL, el diámetro de las fibras mostró una reducción del 49.7 % ($p = 1.8 \times 10^{-8}$), un incremento de casi 3 veces en los núcleos concéntricos ($p = 0.001$) y una reducción en el tiempo de fatiga del 63.9 % ($p = 0.011$). Las fuerzas tetánicas por CSA de los músculos RF y SOL mostraron reducciones del 13.8 % ($p = 2.0 \times 10^{-4}$) y 48.6 % ($p = 0.003$), respectivamente, en comparación con el grupo control. Las fuerzas específicas mostraron reducciones máximas del 9.4 % para el RF y del 48.6 % para el SOL, aunque estas diferencias no fueron significativas. Tanto los músculos RF como los SOL mostraron una mayor presencia de colágeno en comparación con el control. Se encontraron cambios significativos en los porcentajes de fibras tipo I y II únicamente en el músculo SOL. El porcentaje de fibras tipo II del músculo RF alcanzó el 62.3 %, mientras que el porcentaje de fibras tipo I del músculo SOL alcanzó el 62.7 % ($p = 4.5 \times 10^{-4}$).

Conclusiones: Se ha determinado los cambios morfológicos, histoquímicos y mio-mecánicos en los músculos esqueléticos de ratones sometidos a inmovilización o HIIT de resistencia. Los músculos oxidativos lentos (SOL) fueron los más afectados en cualquiera de los dos modelos experimentales.

Palabras clave: Inmovilización, HIIT, Propiedades mio-mecánicas, H&E, NADH-TR, Tricromía de Masson.

Abstract

Introduction: Skeletal muscles have a great capacity to adapt to various experimental conditions modifying their structure and cellular microenvironment in response to changes in muscle activity. In this work, we examine the morphological, histochemical, and myo-mechanical changes experienced by the skeletal muscles of mice subjected to immobilization or high-intensity interval endurance training (HIIT).

Objective: Determine the morphological, histochemical, and myo-mechanical changes in the skeletal muscle of mice subjected to immobilization or high-intensity interval endurance training (HIIT).

Methodology: A group of 21 C57BL/6J female mice ten-week-old was divided into three subgroups: HIIT (E, n = 7), immobilization (I, n = 7), and control (C, n = 7). The HIIT protocol lasted 10 minutes and was divided in three stages: a 3-minute warm-up phase (12 m/min), three alternating series of increased speed (20 m/min) and active rest (12 m/min) lasting one minute each, and a phase of maximum speed for one minute (28 m/min) performed on a treadmill set at an angle of 26°. HIIT was done 5 days a week for 1 month. The immobilization lasted 21 days and was performed from the hip joint to the metatarsal region in a fully plantar flexed position with the hind limb fully extended using cotton athletic tape and adhesive tape to fix the right hind limb of each mouse. Functional and histological changes were determined by myo-mechanical recordings, H&E, NADH-TR, and Masson's trichrome staining in the *rectus femoris* (RF, fast glycolytic) and *soleus* (SOL, slow oxidative) muscles.

Results: HIIT experiments. In RF muscle there was a reduction of 23.7% ($p=9.0\times 10^{-4}$) in fiber diameters, an increment of 1.7 times of concentric nuclei, and a 27.7% longer fatigue time than the control group. In SOL muscle fiber diameters were 22.7% ($p = 6.5\times 10^{-5}$) smaller, and concentric nuclei were 2.2 times greater ($p = 0.001$) compared to the control, while fatigue time was 35.6% longer. No significant changes were observed in

the percentages of type I and type II fibers compared to the control. There was a lower presence of type II fibers in RF, 63.8 % versus 66.4 % compared to controls, and a lower presence of type I fibers in SOL, 72.6 % compared to 74.1 % in controls. The RF muscle showed a greater presence of collagen compared to control, while the SOL muscle showed a lower presence of collagen compared to control. Tetanic force per cross-sectional area (CSA) of the RF was 10.3 % smaller than control, while the tetanic force per CSA of the SOL exceeded the control by 31.4 % ($p = 0.003$). No significant differences were found between specific forces, however, the maximum percentage differences for RF and SOL muscles were 12.5 % and 55.9 %, respectively.

Immobilization experiments. In RF muscle the fiber diameter showed a reduction of 40.7 % ($p = 3.2 \times 10^{-6}$), an increment of 4.1 times of concentric nuclei ($p = 8.8 \times 10^{-5}$), and a 0.9 % decrease in fatigue time. For SOL muscle, the fiber diameter showed a reduction of 49.7 % ($p = 1.8 \times 10^{-8}$), an increment of almost 3-times of concentric nuclei ($p = 0.001$), and a reduction in the fatigue time of 63.9 % ($p = 0.011$). Tetanic forces per CSA of the RF and SOL muscles showed reductions of 13.8 % ($p = 2.0 \times 10^{-4}$) and 48.6 % ($p = 0.003$), respectively, compared to the control group. The specific forces showed maximum reductions of 9.4 % for RF and 48.6 % for SOL, although these differences were not significant. Both RF and SOL muscles showed a greater presence of collagen compared to control. Significant changes in the percentages of type I and II fibers were found only in the SOL muscle. The percentage of type II fibers of RF muscle reached 62.3 %, while the percentage of type I fibers of SOL muscle reached 62.7 % ($p = 4.5 \times 10^{-4}$).

Conclusions: We determined the morphological, histochemical, and myo-mechanical changes in the skeletal muscles of mice subjected to immobilization or HIIT. The slow oxidative muscles (SOL) were the most affected in any of the two experimental models.

Keywords: Immobilization, HIIT, Myo-mechanical properties, H&E, NADH-TR, Masson's trichrome.

Capítulo 1

Introducción

Los músculos esqueléticos pueden ser descritos como estructuras anatómicas y biomecánicas conformados por diferentes componentes celulares que interactúan entre sí con la finalidad de generar contracción, fuerza muscular y movimiento. Adicionalmente, los componentes celulares de los músculos también interactúan con nervios sensitivos y motores para la transmisión de los impulsos, un arreglo vascular que proporciona oxigenación eficiente y una maquinaria reguladora y metabólica integrada para mantener la homeostasis¹ celular [2]. Después de varios años de investigación de la fisiología del músculo esquelético se han logrado comprender ciertos aspectos de la complejidad estructural y funcional de este tipo de tejido, revelando algunos de los procesos importantes de la interacción molecular requerida para la función muscular eficiente [2, 3]. Los tejidos musculares tienen una gran capacidad de adaptación, ya que pueden modificar su estructura y microambiente celular en respuesta a diferentes condiciones, entre las cuales se encuentran: lesiones, actividad contráctil, entrenamiento intenso, sobrecarga mecánica, consumo de nutrientes, entre otras [4, 5].

Para el estudio de los cambios adaptativos que suceden en el músculo esquelético se recurre al empleo de modelos animales que semejen lo que ocurre en el ser humano. Estos estudios tienen el propósito de determinar los cambios morfológicos y funcionales del músculo esquelético en respuesta a diferentes procesos fisiológicos o patológicos. Entre los modelos más implementados se encuentran los modelos de experimentación en murinos [4, 6]. Los murinos tienen un sistema musculoesquelético que se desarrolla rápidamente,

¹La homeostasis es la propiedad de un sistema en la que las variables están reguladas de manera que las condiciones internas permanecen estables y relativamente constantes [1].

desde el período postnatal hasta la etapa adulta pueden transcurrir entre 48 y 60 días [7], lo que los convierte en una buena elección para estudios que requieran un gran tamaño muestral. Sin embargo, es necesario tener presente que existen diferencias entre especies, por lo que aunque el murino sea un buen modelo del músculo esquelético de humano no es 100 % igual. En el humano el músculo se compone de diferentes proporciones de fibras rápidas, intermedias y lentas [8]. Esta heterogeneidad en los tipos de fibra debe tenerse en consideración al extender los resultados de los modelos animales a los humanos.

Existe una gran variedad de situaciones especiales para los músculos esqueléticos; sin embargo, de manera particular, se pueden establecer dos condiciones comunes para este tipo de tejido: las lesiones musculoesqueléticas y el entrenamiento muscular. Tanto las lesiones musculoesqueléticas como el entrenamiento muscular se caracterizan por provocar adaptaciones en la estructura celular, el metabolismo y la función de los músculos esqueléticos. Las adaptaciones musculares involucran muchos tipos de células diferentes, incluidas las células satélite, las células inmunitarias, las células endoteliales, los pericitos y las células progenitoras fibroadipogénicas [9, 10]. Estas células actúan en el tejido muscular en respuesta a varios estímulos que surgen directa o indirectamente de las condiciones musculares, activando proteínas y enzimas complementarias asociadas al daño, reparación y remodelación del tejido muscular [9, 10].

Las lesiones musculoesqueléticas hacen referencia a cualquier tipo de daño en el sistema musculoesquelético; es decir, lesiones en los músculos, tendones, esqueleto, cartílago, sistema vascular, ligamentos y nervios, causadas por esfuerzos mecánicos, padecimientos patológicos o inactividad física [11]. Las lesiones en el músculo esquelético pueden producirse de diversas formas, que incluyen traumatismos directos por contusiones musculares, laceraciones y distensiones, o traumatismos indirectos por enfermedades degenerativas como la distrofia muscular [12]. En el ámbito clínico, los atletas profesionales son los más afectados por este tipo de lesiones, llegando a representar hasta el 55 % de todas las lesiones para esta población [12]. El entrenamiento muscular, por otra parte, comprende todo tipo de rutinas de ejercicios que realizadas de manera periódica generan respuestas adaptativas en las fibras musculares de los músculos esqueléticos. La adaptación muscular dependerá del tipo de estímulo realizado durante el ejercicio, por ejemplo, los entrenamientos de hipertrofia inducen un aumento del área de sección transversal de las fibras musculares para hacer frente a mayores cargas, mientras que los entrenamientos de resistencia provocan

mayores cambios metabólicos, permitiendo que los músculos se vuelvan más resistentes a la fatiga [9].

En el ámbito médico, la inmovilización muscular evita la generación de contracciones musculares anormales y la producción de lesiones secundarias durante el tratamiento de una fractura o inestabilidad articular. No obstante, los músculos inmovilizados y en desuso sufren cambios morfológicos, metabólicos y funcionales que conducen a la atrofia muscular, desencadenando procesos de apoptosis² en las células del músculo esquelético [14]. Un excelente modelo aplicado en murinos para el estudio de lesiones musculoesqueléticas es la inmovilización de una extremidad; este tipo de experimento permite simular condiciones patológicas que afectan el músculo esquelético o lesiones derivadas de la inactividad física extrema. Por otro lado, para el caso del entrenamiento muscular, existen una gran variedad de protocolos de ejercitación que pueden ser aplicados a los murinos; uno de los protocolos más fáciles de implementar es la carrera en cinta caminadora [9], ya que los murinos se caracterizan por presentar un fuerte impulso intrínseco para correr grandes distancias [4]. Adicionalmente, se pueden aplicar modificaciones al régimen de entrenamiento, aumentando la dificultad y los intervalos de intensidad, con el fin de inducir los cambios musculares de interés, como por ejemplo, la hipertrofia muscular o la resistencia a la fatiga muscular [9]. Los cambios morfológicos, histoquímicos y funcionales del músculo esquelético, tanto para la inmovilización como para el entrenamiento, pueden cuantificarse mediante diferentes técnicas, entre las que se encuentran los registros mio-mecánicos, las tinciones histológicas e histoquímicas, la cuantificación de proteínas, la determinación de fatiga *in vivo*, el análisis de marcha, entre otras.

En este estudio, se consideran suficientes los registros mio-mecánicos y las tinciones histológicas e histoquímicas para la cuantificación de los cambios musculares. Los registros mio-mecánicos permiten evaluar la generación de fuerza y la fatigabilidad de los músculos después de un determinado experimento [15]; mientras que las tinciones histológicas e histoquímicas revelan los elementos constituyentes de las células musculares, las características morfológicas de las fibras, así como sus propiedades metabólicas [16, 17]. El Laboratorio de Mecanobiología del Músculo de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México tiene el equipo suficiente para realizar este tipo de estudios;

²La apoptosis es la muerte programada de las células del organismo en un proceso dependiente de ATP y mediado por diferentes enzimas [13].

sin embargo, es necesario implementar un protocolo de experimentación integral que abarque tanto a los modelos de inmovilización como a los de entrenamiento, estableciendo una metodología para el análisis de los cambios en el músculo esquelético bajo diferentes condiciones experimentales, relacionando los registros mio-mecánicos con las características morfológicas y bioquímicas de las fibras musculares.

1.1. Antecedentes

Estudios previos han evaluado el efecto de diferentes períodos de inmovilización en el proceso de pérdida de masa muscular y los cambios fisiológicos experimentados por los músculos esqueléticos. Este tipo de estudios han sido implementados en murinos con diferentes condiciones fisiológicas o patológicas [14, 18], incluyendo especímenes con alteraciones metabólicas que afectan el músculo esquelético, como por ejemplo la caquexia³ inducida por el cáncer [19]. Con respecto a la caquexia, Mañas-García *et al.* publicaron una investigación en la que implementaron un modelo de inmovilización por descarga en las extremidades traseras de ratones caquéticos. Los resultados mostraron que el *gastrocnemius* de los ratones inmovilizados presentaron atrofia muscular severa y deterioro de la función, junto con aumentos en la proteólisis⁴ muscular, la autofagia⁵, el daño muscular y el deterioro de la regeneración muscular [19].

En otro estudio, realizado por Foresto *et al.*, se investigaron los mecanismos morfológicos y moleculares involucrados en la atrofia inducida por inmovilización en los músculos *soleus* de ratas en diferentes etapas de desarrollo posnatal. Las tinciones histológicas confirmaron la atrofia muscular y la reducción de la sección transversal de las fibras musculares en los grupos de inmovilización; estos resultados estuvieron acompañados de una disminución de los marcadores de síntesis de proteínas, un aumento de la autofagia y el cambio entre fibras musculares lentas y rápidas. Además, los datos reportados muestran que los trastornos musculares inducidos por la inmovilización dependen de la edad. Todos estos

³La caquexia es un síndrome multiorgánico, multifactorial y a menudo irreversible asociado con el cáncer y otras enfermedades crónicas graves [19, 20]. Se caracteriza por la pérdida de la masa del músculo esquelético y el tejido adiposo impulsada por los cambios metabólicos inducidos por la enfermedad [21].

⁴La proteólisis describe el procesos de división de proteínas en componentes más pequeños (polipéptidos o aminoácidos) que ocurre típicamente para activar o alterar la funcionalidad de las proteínas celulares [22].

⁵La autofagia se identificó originalmente como una forma de muerte celular programada y se refiere al proceso que implica la descomposición de componentes intracelulares a través de lisosomas [23, 24].

hallazgos indican que se debe tener especial consideración en la determinación de los mecanismos celulares y moleculares de la respuesta atrófica en los lactantes, con el fin de desarrollar terapias eficaces para este grupo etario [18].

Por otro lado, Suh *et al.* publicaron un trabajo que analizó las diferencias en la contracción muscular, la respuesta apoptótica y el contenido de proteína muscular en relación con la duración y el grado de inmovilización en el músculo *soleus* de rata. Los resultados indicaron cambios en la carga dinámica de peso, presencia de atrofia muscular y niveles significativamente reducidos de MYH en los músculos inmovilizados, también se evidenció un aumento significativo en la expresión de Bax y MyoD, así como en el número de núcleos apoptóticos. Las proteínas Bax y MyoD están relacionadas con los procesos de apoptosis, diferenciación y reparación en las fibras musculares; mientras que la proteína MYH es la cadena pesada de miosina presente en las fibras, la cual puede experimentar cambios en respuesta a estímulos mecánicos, atrofia o ejercicio muscular. Estos resultados indican que la inmovilización prolongada a largo plazo puede aumentar los cambios apoptóticos y disminuir las proteínas de formación muscular en el músculo esquelético [14].

En cuanto a los modelos de entrenamiento, los estudios realizados han explorado los cambios adaptativos de los músculos esqueléticos en respuesta al ejercicio muscular en diferentes etapas etarias. Los protocolos de entrenamiento que se han implementado en los murinos son variados, pero todos están enfocados en generar cambios morfológicos, metabólicos y funcionales en los músculos ya sea mediante la hipertrofia o la resistencia muscular. En relación a esto, Olesen *et al.* presentaron un trabajo en el que investigaron los efectos del envejecimiento y el ejercicio con alta o baja resistencia sobre la composición y las propiedades mecánicas del tejido conectivo intramuscular. Las propiedades mecánicas que se midieron fueron la fuerza pasiva máxima, las curvas medias tensión-deformación submáximas y los valores de estrés. Los datos reportados en esta investigación indicaron una mayor cantidad de tejido conectivo intramuscular en los músculos *soleus* y *gastrocnemius* de los ratones viejos y las propiedades mecánicas del tejido conectivo aislado de los músculos también fueron mayores a una edad avanzada; sin embargo, estos cambios están relacionados con la edad y no se vieron afectados significativamente por el ejercicio realizado, con o sin resistencia [25].

En lo que respecta a lesiones musculares inducidas por el ejercicio, Zuo *et al.* publicaron un estudio que analizó los cambios fenotípicos de los macrófagos involucrados en la regeneración del músculo esquelético *soleus*. Los datos obtenidos evidenciaron que las

sesiones de ejercicio excéntrico causan lesiones en el músculo, caracterizadas por fibras musculares de pequeño diámetro acompañadas de células mononucleadas infiltradas en los espacios intersticiales. También se observó fagocitosis de fibras necróticas con células necróticas masivas. Se demostró que los macrófagos M1 se infiltraron principalmente en los sitios necróticos del músculo, mientras que los macrófagos M2 estuvieron presentes en los músculos desde el inicio del ejercicio realizando diferentes funciones durante la lesión y la recuperación del músculo esquelético [26].

Por otra parte, en un estudio desarrollado por Seldeen *et al.* se analizó los impactos del entrenamiento de intervalos de alta intensidad durante el envejecimiento, comparando ratones sedentarios de 24 meses de edad con ratones de la misma edad sometidos a sesiones de entrenamiento. Los músculos de los ratones ejercitados exhibieron una mayor masa, un tamaño de fibra más grande, un aumento en la biomasa mitocondrial y una mayor cantidad de fibras lentas en comparación con los ratones sedentarios, lo cual implica una mayor capacidad aeróbica. Con este estudio, se comprobó que el ejercicio a intervalos de alta intensidad conlleva al mejoramiento del rendimiento muscular, modificando la fisiología muscular y reduciendo la fragilidad a la fatiga [27].

1.2. Planteamiento del problema

En las últimas décadas se ha observado un gran interés en la aplicación de modelos experimentales murinos para el estudio de los mecanismos subyacentes de muchas enfermedades. Cada vez se están modelando más enfermedades humanas en ratas y ratones, con el fin de desarrollar nuevos medicamentos, monitorear la progresión de diferentes enfermedades y evaluar la efectividad de distintos tratamientos [8, 28]. En particular, para el caso de los músculos esqueléticos, existe una amplia variedad de modelos experimentales que han sido empleados para comprender la patogenia de distintos padecimientos y desarrollar, desde el ámbito preclínico, varios enfoques terapéuticos [29]. Respecto a esto, los ratones se han posicionado como el organismo vivo más utilizado en la investigación de enfermedades musculares, llegando a establecerse como el modelo de mamífero preferido para intervenciones más complejas, como la intervención genética y la intervención farmacológica contra la degeneración muscular [8, 29]. Con el objetivo de establecer metodologías de análisis que permitan estudiar los cambios morfológicos y funcionales de los músculos esqueléticos sometidos a condiciones especiales, es posible establecer dos modelos

animales experimentales que representen dos situaciones contrarias en las que los músculos esqueléticos normalmente pueden encontrarse: la atrofia debido al desuso muscular (inmovilización) y el entrenamiento muscular. En este trabajo se propone implementar una metodología general que permita analizar en conjunto las propiedades mio-mecánicas y las características morfológicas e histoquímicas de los músculos esqueléticos sometidos a estas dos condiciones de experimentación. La idoneidad de estos modelos animales depende de lo bien que simulen los procesos fisiológicos humanos; en este caso, los modelos de inmovilización y entrenamiento en caminadora son adecuados para representar, respectivamente, las condiciones humanas de atrofia y entrenamiento muscular, considerando dos músculos distintos del miembro inferior de los ratones: el *rectus femoris* y el *soleus*.

1.3. Justificación

La estructura interna de los tejidos determina gran parte de su función biológica [30, 31], por lo que entender los cambios producidos en la estructura interna de los músculos esqueléticos debido a la inmovilización, o condiciones de entrenamiento, podría ser de gran interés científico y clínico. La disponibilidad de modelos en ratones juega un papel importante en el estudio de los cambios morfológicos y funcionales de los músculos y, a pesar de que existen diferencias en algunas características fisiológicas en comparación con los humanos, estos modelos animales proporcionan información relevante sobre las relaciones causales y los mecanismos celulares funcionales que se presentan en respuesta adaptativa a condiciones de atrofia y entrenamiento muscular [8, 27, 29]. La atrofia del músculo esquelético inducida por el desuso siempre ha sido un tema de interés en el ámbito médico, al igual que los beneficios del ejercicio físico en el desarrollo y mantenimiento muscular [32, 33]; sin embargo, es usual que los estudios realizados respecto a estos temas aborden los cambios mio-mecánicos, morfológicos e histoquímicos de manera separada, sin considerar todos estos aspectos en conjunto dentro de un mismo estudio [14, 18, 27]. Sería importante implementar un protocolo general de estudio que posibilite el análisis integral de todas estas propiedades y características de los músculos sometidos a estos modelos de experimentación, conformando una base de investigación preclínica preliminar para futuras investigaciones que se encarguen de intervenciones farmacológicas y terapias de ejercicio aplicables en humanos. Particularmente, en el Laboratorio de Mecanobiología del Músculo de la Facultad de Ciencias de la UNAM, se propone aplicar esta metodología de estudio utilizando técnicas de histología, histoquímica y registros mio-mecánicos para el análisis

de los cambios experimentados por los músculos esqueléticos en diferentes condiciones experimentales, de tal manera que se pueda realizar un vínculo traslacional entre la parte de ciencia básica y la parte clínica.

1.4. Hipótesis

El estudio de las propiedades mio-mecánicas, histológicas e histoquímicas de los músculos esqueléticos permite diferenciar los distintos cambios adaptativos que se presentan en los músculos sometidos a modelos de entrenamiento e inmovilización muscular, dependiendo del tipo de fibras musculares que los componen, y determinar qué tipo de músculo es más afectado por los modelos experimentales con base al análisis de los cambios en las variables estudiadas: la fuerza muscular, la reducción de los diámetros de las fibras musculares, el aumento en la presencia de núcleos concéntricos, la conversión entre distintos tipos de fibras y las variaciones en la presencia de colágeno y fibrosis.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Determinar los cambios morfológicos, histoquímicos y mio-mecánicos en el músculo esquelético de ratones que han sido sometidas a modelos de inmovilización o entrenamiento muscular.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Implementar un protocolo de entrenamiento de resistencia de intervalos de alta intensidad que permita generar cambios morfológicos y funcionales en los músculos esqueléticos de los ratones de la cepa C57BL/6J.
2. Implementar un protocolo de inmovilización que permita generar cambios morfológicos y funcionales en los músculos esqueléticos de los ratones de la cepa C57BL/6J.
3. Determinar las propiedades mio-mecánicas y los cambios morfológicos e histoquímicos de los músculos *rectus femoris* y *soleus* después de haber sido sometidos a modelos de entrenamiento de resistencia e inmovilización.

4. Comparar la susceptibilidad a los cambios morfológicos, histoquímicos y mio-mecánicos de los músculos *rectus femoris* y *soleus* después de haber sido sometidos a modelos de entrenamiento de resistencia e inmovilización.

1.6. Estructura del trabajo

El Capítulo 1 contiene la introducción y los antecedentes del proyecto investigativo. Se presentan aspectos generales de los modelos experimentales realizados en los músculos esqueléticos, así como sus consecuencias morfológicas, metabólicas y funcionales. También se determina el planteamiento del problema, su justificación, la hipótesis y los objetivos a alcanzar al finalizar el trabajo de investigación.

En el Capítulo 2 se presenta el marco teórico fundamental para el desarrollo del presente trabajo. Se discuten generalidades del músculo esquelético, su estructura, funcionamiento, tipos de fibras que lo constituyen y los cambios que experimenta al someterlo a condiciones de atrofia y entrenamiento. También se describen ciertos aspectos concernientes a la experimentación con ratones de laboratorio, sus características fisiológicas y conductuales, los procedimientos adecuados para el mantenimiento de estos animales y la anatomía de interés para este trabajo. Por último, se describen las técnicas que se pueden utilizar para el estudio de músculo esquelético en ratones de laboratorio, enfocando la temática en las dos técnicas de análisis que se utilizaron en este estudio: registros mio-mecánicos y tinciones histológicas e histoquímicas.

En el Capítulo 3 se describe la metodología implementada para alcanzar los objetivos planteados. En este apartado se especifican los animales que se utilizarán, las condiciones en las que se mantendrán los sujetos de experimentación y los modelos experimentales que se aplicarán. También se describe detalladamente los materiales y equipos que se utilizaron para las técnicas de análisis muscular. Adicionalmente, se especifican los protocolos que se llevaron a cabo para los modelos experimentales de inmovilización y entrenamiento, los registros mio-mecánicos y las tinciones histológicas e histoquímicas.

En el Capítulo 4 se presentan los resultados para los distintos parámetros medidos en los animales de experimentación y control, incluyendo la discusión de estos resultados en relación con las características fisiológicas y morfológicas de los músculos bajo estudio. Se muestran las ingestas de alimentos y líquidos de los animales durante el tiempo de

experimentación y monitorización; también se presentan los cambios observados en los pesos corporales y los parámetros morfométricos de los especímenes a lo largo de las semanas. Las propiedades mio-mecánicas y las características morfológicas e histoquímicas de los músculos esqueléticos también son presentadas en este apartado. Finalmente, en el Capítulo 5 se muestran las conclusiones alcanzadas con base a los resultados en relación con los objetivos planteados.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Generalidades del músculo esquelético

El cuerpo humano posee aproximadamente 700 músculos esqueléticos y, en condiciones normales, pueden llegar a representar alrededor del 40 % de la masa corporal [12, 34, 35]. Los músculos esqueléticos son capaces de realizar movimientos tanto voluntarios como involuntarios y son esenciales para el mantenimiento de la postura [36], además de cumplir funciones importantes en la regulación térmica, el equilibrio nutricional, la captación de la glucosa y la actividad endocrina [37, 38]; por lo tanto, constituyen uno de los sistemas anatómicos y fisiológicos más relevantes en las interacciones de los individuos con el entorno, siendo responsables de las actividades físicas cotidianas que tienen un gran impacto en la calidad de vida [39–41].

2.1.1. Estructura del músculo esquelético

Los músculos esqueléticos, también denominados como músculos estriados, presentan una organización jerárquica, es decir, su estructura interna está organizada en diferentes niveles que contienen distintos componentes anatómicos y funcionales (Figura 2.1). En el primer nivel se encuentra el epimisio, que es una capa de tejido conectivo elástico fibroso que envuelve superficialmente a todo el músculo esquelético [34]. En el siguiente nivel, hacia el interior del epimisio, el músculo se organiza en filamentos gruesos de tejido conocidos como fascículos. Los fascículos, a su vez, se encuentran rodeados completamente por una

capa de tejido conectivo, el perimisisio, y sus diámetros pueden variar dependiendo de la cantidad de células musculares que se encuentren en su interior [42]. Normalmente, un fascículo contiene alrededor de 1000 células musculares multinucleadas [34], aunque este número puede variar considerablemente dependiendo del tipo de músculo, su tamaño y su función [43, 44].

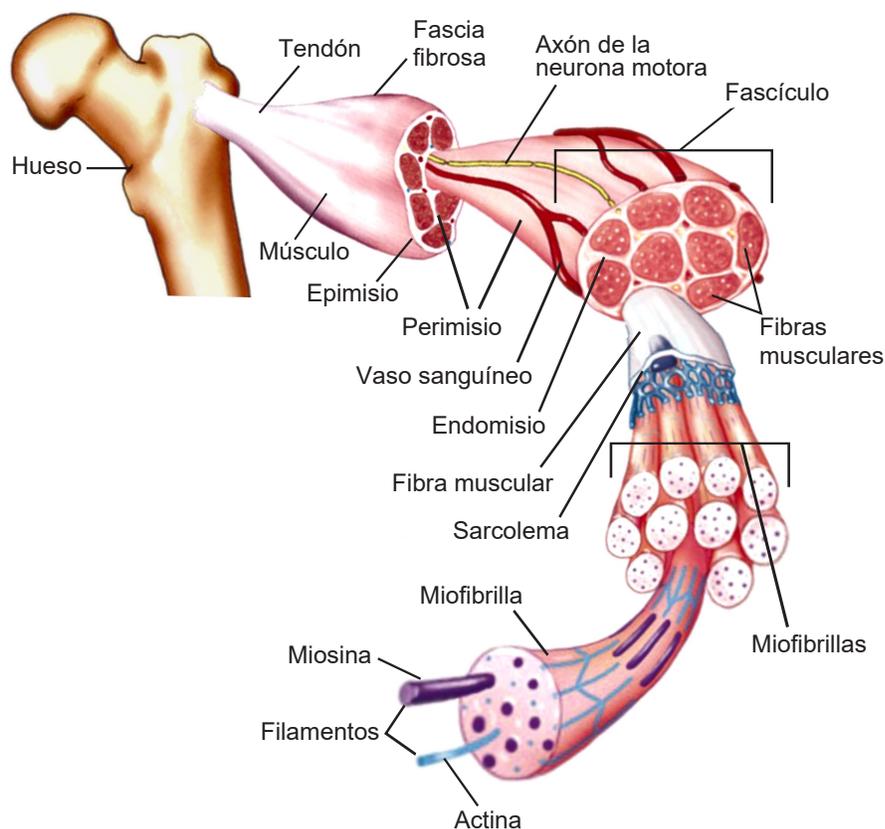


Figura 2.1: Estructura jerárquica del músculo esquelético: organización del músculo esquelético desde el nivel macroscópico hasta el nivel molecular. Figura adaptada de [45].

Una célula muscular puede abarcar toda la longitud del músculo esquelético, llegando a alcanzar longitudes de hasta 30 cm, con diámetros que oscilan entre $10 \mu\text{m}$ y $100 \mu\text{m}$; es precisamente por esta proporción, entre la longitud y el diámetro de las células musculares, que estas estructuras son nombradas a menudo como fibras musculares o miofibras⁶ [34, 47, 48]. El tejido conectivo que rodea las fibras musculares se denomina endomisisio, por debajo de este tejido se encuentra la membrana celular, conocida como sarcolema, que ocupa alrededor del 80% del volumen de la fibra muscular [34, 45]. Cada fibra muscular

⁶El prefijo “mio” proviene del griego “mys” que significa músculo [46].

se compone de cientos, o a veces miles, de estructuras llamadas miofibrillas, las cuales abarcan toda la longitud de la fibra muscular y presentan secciones transversales de 1 hasta $2 \mu\text{m}$ [34, 45, 47]. Estas miofibrillas se componen de miles de unidades repetitivas, denominadas sarcómeros, que constituyen las unidades estructurales y funcionales básicas de la contracción muscular [34, 42].

Además de las fibras musculares, el músculo esquelético está compuesto por otro tipo diferente de células, las células satélite, las cuales son células troncales generadoras de músculo esquelético y se encuentran ubicadas debajo del sarcolema [49]. Por otra parte, los espacios existentes entre diferentes músculos son llenados por estructuras fibrosas de tejido conectivo conocidas como fascias. Los extremos de los músculos esqueléticos se encuentran fusionados a los tendones, los cuales son tejidos conectivos más resistentes que permiten que los músculos se fijen en otras estructuras, como los huesos y otros tejidos conectivos [34, 42]. Los extremos del músculo obtienen diferentes denominaciones dependiendo de la movilidad de la estructura a la que se encuentren fijados; si la estructura de fijación presenta poca movilidad, el extremo del músculo esquelético recibe el nombre de origen, mientras que a los extremos que se unen a estructuras de mayor movilidad se los denominan inserciones [42].

2.1.2. Ultraestructura muscular

2.1.2.1. Sarcolema y túbulos transversales

El sarcolema (Figura 2.2) es una cubierta exterior de la fibra muscular que está constituido por una capa externa de tejido conectivo de aproximadamente 20 nm de grosor, llamada lámina basal, y una membrana plasmática interna, conocida como plasmalema, que define la frontera de la fibra muscular [34, 47]. Estas dos estructuras, la lámina basal y el plasmalema, se encuentran separadas por un espacio de 20 nm [34]. La lámina basal es permeable y está compuesta por colágeno y glucoproteínas; el plasmalema, por otra parte, presenta receptores especializados y canales de proteínas incrustados en su bicapa proteolipídica, los cuales regulan la entrada y salida de iones y moléculas en la célula [34]. Por otro lado, los túbulos transversales (Figura 2.2), o túbulos T, se describen como invaginaciones que se extienden dentro de la membrana plasmática hacia el citoplasma de la fibra muscular, o sarcoplasma, llevando en su interior líquido proveniente del espacio extracelular de la fibra [50].

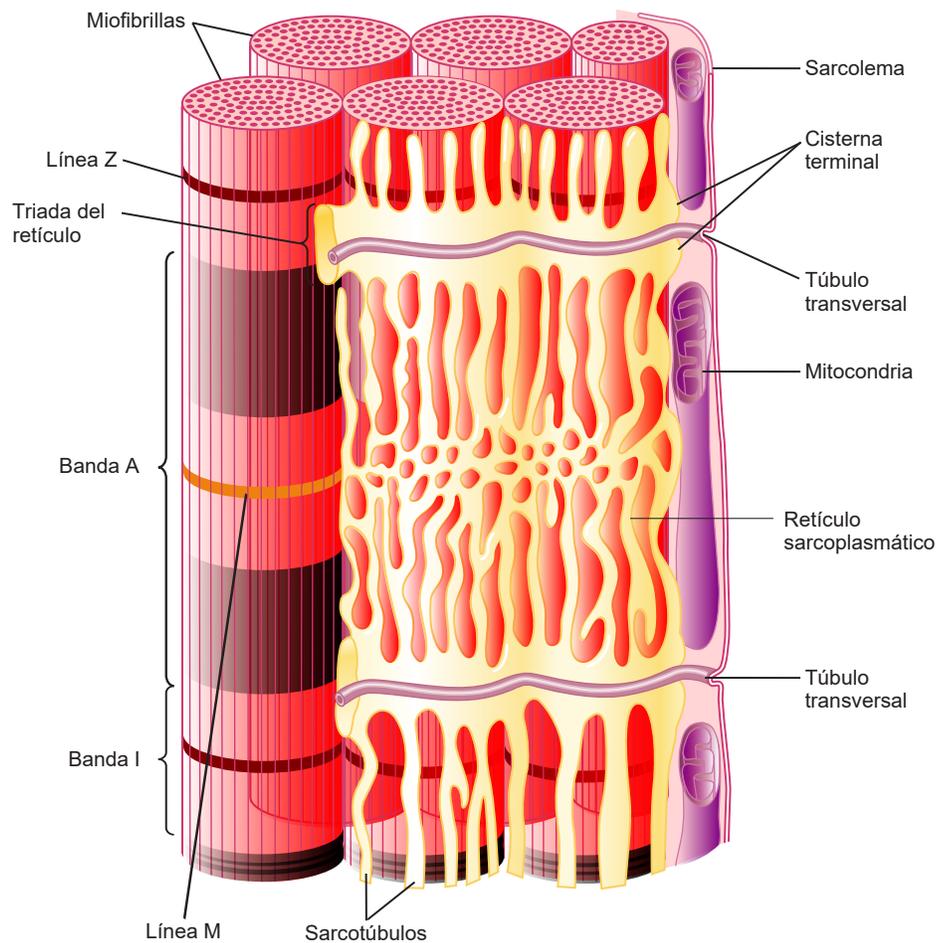


Figura 2.2: Sarcolemma, túbulos transversales (túbulos T) y retículo sarcoplásmico. La ilustración muestra la formación de las triadas entre las cisternas terminales y los túbulos T. La figura representa un músculo de mamífero, que tiene dos túbulos T por sarcómero ubicados en las uniones de las bandas A-I. Figura adaptada de [47].

2.1.2.2. Retículo sarcoplásmico

El retículo sarcoplásmico (Figura 2.2) es un tipo de retículo endoplasmático liso que está en estrecho contacto con los túbulos T y consiste en una red de túbulos que encierran las miofibrillas dentro de la fibra muscular. Los túbulos del retículo sarcoplásmico se ensanchan en la región que entra en contacto con los túbulos T, formando dos cavidades separadas a cada lado de los túbulos transversales. Las dos cavidades separadas reciben el nombre de cisternas terminales y el conjunto de estructuras, las dos cisternas terminales y el túbulo T, se le conoce como triada [34, 50, 51]. Es en la triada donde se liberan los iones

de calcio al sarcoplasma para permitir la contracción muscular. En la membrana del retículo sarcoplasmático se encuentra incrustado un canal de liberación de calcio del receptor de rianodina (RyR), el cual libera iones de calcio desde el retículo sarcoplásmico hacia el sarcoplasma [50]. Adicionalmente, la red de túbulos del retículo sarcoplásmico contiene una membrana llena de bombas de calcio especializadas, Ca^{2+} ATPasa, que recapturan iones de calcio sarcoplásmico de regreso al retículo sarcoplásmico y, posteriormente, trasladan estos iones a las cisternas terminales para su almacenamiento [34].

2.1.2.3. Miofibrilla y sarcómero

Cada miofibrilla (Figura 2.3 A) se compone de miles de sarcómeros distribuidos longitudinalmente [45]. En un músculo en reposo, los sarcómeros presentan una longitud promedio aproximada de $2.5 \mu\text{m}$ y un diámetro de 1 a $2 \mu\text{m}$ [42, 51]. La estructura del sarcómero se organiza en base a tres miofilamentos superpuestos longitudinalmente (Figura 2.3 B): filamentos de miosina (filamentos gruesos), filamentos de actina (filamentos delgados) y filamentos de titina [34, 42, 52]. Un sarcómero puede llegar a contener alrededor de 1000 filamentos de miosina y 2000 filamentos de actina, aunque este número puede variar dependiendo del músculo [34]. A lo largo del sarcómero se pueden identificar diferentes zonas delimitadas por líneas de proteínas que determinan bandas que contienen distintos tipos de miofilamentos (Figura 2.3 A y B); las bandas y líneas que se pueden distinguir son las siguientes: línea Z, línea M, banda I, banda A, zona H y zona desnuda [47, 51].

La línea Z, también llamada disco Z, determina los límites longitudinales del sarcómero y está compuesta por proteínas filamentosas [47]. En la línea Z se conectan los filamentos de actina de los sarcómeros adyacentes, así como los filamentos de titina [34]. El disco Z divide a la mitad una región constituida únicamente por filamentos de actina, denominada banda I que abarca dos porciones pertenecientes a dos sarcómeros [51]. Junto a la banda I se encuentra la banda A, que está compuesta por filamentos de miosina y actina superpuestos; sin embargo, dentro de esta banda existe una región central que no contiene filamentos de actina, conocida como zona H [34]. Cada filamento de miosina de la zona H está conformado por dos regiones: una zona que contiene la proyección de la cabeza de miosina, que se une a los filamentos de actina para formar los denominados puentes cruzados [42], y otra porción que contiene únicamente la cola de la molécula de miosina [47]. Con base a la composición de los filamentos de miosina, se puede definir una zona desnuda en el interior de la zona

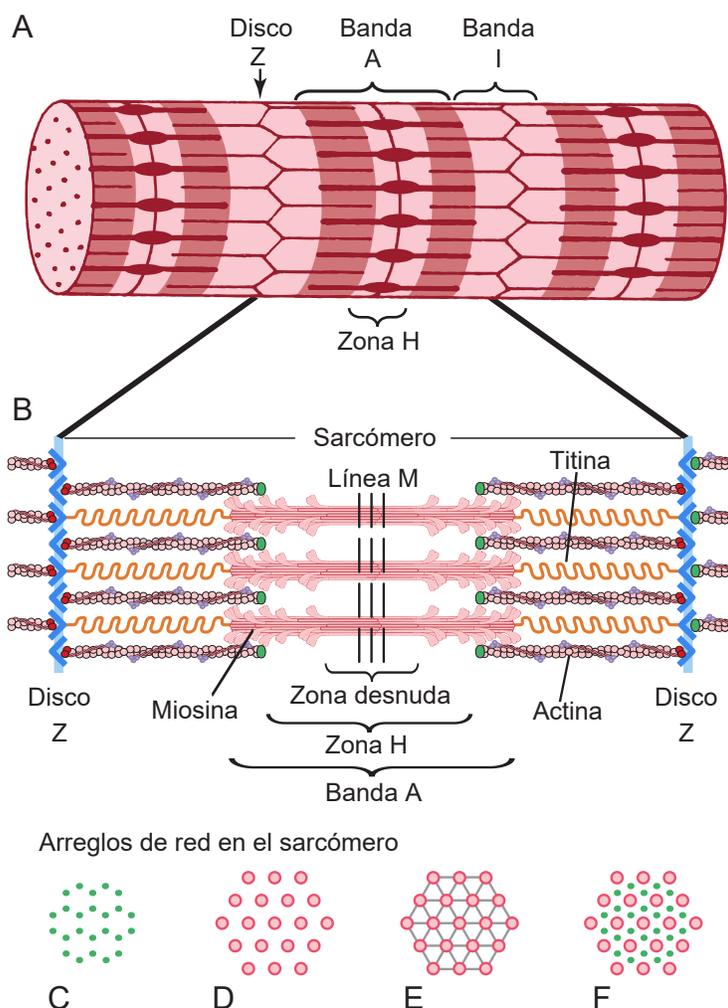


Figura 2.3: Organización y estructura de la miofibrilla y el sarcómero. La figura muestra un segmento de miofibrilla compuesta de varios sarcómeros (A) y la estructura del sarcómero, junto con sus miofilamentos constituyentes (B). También se muestran diferentes arreglos de red en el sarcómero dependiendo de los miofilamentos y proteínas que constituyan la sección transversal: filamentos de actina (C), filamentos de miosina (D), filamentos de miosina en la línea M (E) y filamentos de miosina y titina superpuestos (F). Figura adaptada de [47, 53].

H, esta zona se ubica en el medio de cada filamento de miosina y es una región que no contiene cabezas de miosina por lo que no se forman puentes cruzados [34]. Adicionalmente, dentro de la zona H, hay una banda oscura estrecha llamada línea M, que divide en dos al sarcómero y está compuesta por varias proteínas distintas de la miosina que unen los filamentos de miosina adyacentes transversalmente al eje largo, lo que ayuda a estabilizar la red de la banda A [34, 42, 51].

La zona H y la banda I son las regiones del sarcómero que se acortan durante la

contracción muscular, mientras que la banda A permanece sin cambios en su longitud [51]. La titina se extiende desde la línea Z hasta la línea M y ayuda a mantener los miofilamentos alineados entre sí, además de evitar que el músculo se estire demasiado [34]. Dependiendo de la región del sarcómero se pueden observar diferentes arreglos y superposiciones de filamentos (Figura 2.3 C - F), los cuales constituyen arreglos de red en su sección transversal [47, 52].

2.1.2.4. Filamentos de miosina

Los filamentos de miosina se encuentran en la banda A del sarcómero, contienen entre 200 y 500 moléculas de miosina, además, poseen un filamento de titina, de 1 nm de diámetro, que atraviesa el centro de estos filamentos [34]. Los filamentos de miosina tienen alrededor de 1.6 μm de largo y de 10 a 15 nm de diámetro [34, 47]. Como se mencionó anteriormente, cada filamento tiene varias cabezas de miosina (Figura 2.4 A), las cuales se encuentran emparejadas y se proyectan hacia afuera del filamento formando una configuración tipo hélice [47]. En total existen tres hélices concurrentes sobre el mismo eje, cada una con nueve pares de cabezas de miosina por vuelta [34]. Los nueve pares de cabezas de miosina se distribuyen de tal manera que tres cabezas emparejadas se ubican en una misma sección transversal del filamento, formando una configuración conocida como corona [34, 47].

La molécula de miosina tiene una longitud aproximada de 150 nm y un diámetro de 2 nm, y se compone de seis cadenas de proteínas separadas, dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras [52]. La molécula de miosina también se puede dividir en distintos fragmentos (Figura 2.4 A y B): meromiosina pesada (HMM) y meromiosina ligera (LMM) [34]. La región LMM define la cola de la molécula de miosina y consta de dos cadenas pesadas enrolladas, una alrededor de la otra, en forma helicoidal [52]. El fragmento HMM se puede dividir en más subfragmentos: dos regiones de cabeza globular (S1) y una región de brazo (S2) [34]. La región S1 es la que forma el puente cruzado durante las contracciones musculares y es el sitio de unión de la actina y del ATP; de hecho, no existen otros sitios de unión en las regiones S2 y la cola de las moléculas de miosina [34, 52]. Dos cadenas ligeras diferentes se unen a cada cabeza S1, específicamente las cadenas ligeras reguladoras (RLC) y las cadenas ligeras esenciales (ELC). Las RLC desempeñan un papel modulador en la contracción del músculo esquelético, mientras que las ELC participan en la hidrólisis

de ATP a ADP [34]. Las direcciones de la cola y la cabeza de la miosina se invierten cerca del punto medio del filamento, formando una estructura bipolar.

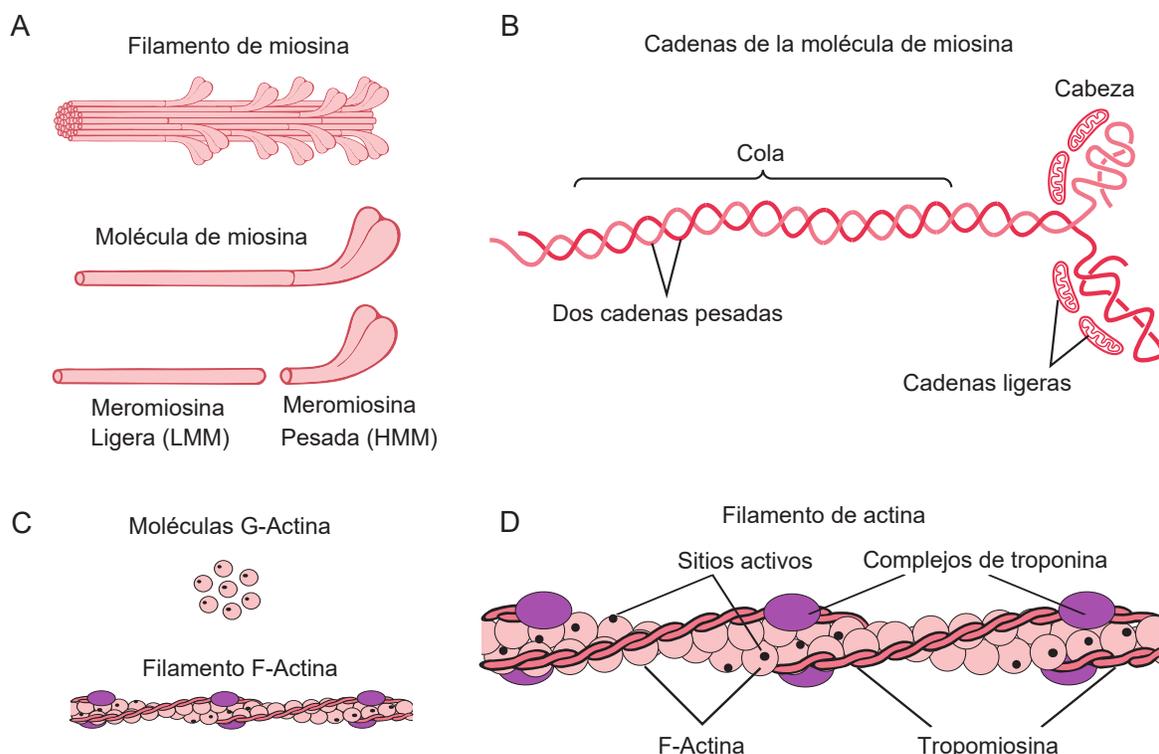


Figura 2.4: Moléculas y filamentos de miosina y actina: componentes moleculares del filamento de miosina (A), esquema de las cadenas de meriomiosina que constituyen la molécula de miosina (B), molécula de actina G (C) y descripción de los componentes del filamento de actina (D). Figura adaptada de [47, 53].

2.1.2.5. Filamentos de actina

Los filamentos de actina tienen un diámetro aproximado de 8 nm y una longitud de 1 μm , y están compuestos por las siguientes proteínas: actina G, actina F, troponina, tropomiosina y nebulina [34, 47]. La unidad básica de este filamento es la actina G, que presenta dos dominios globulares parcialmente separados por una hendidura [52]. La actina G polimerizada forma la actina F (Figura 2.4 C), dando lugar a un filamento similar a una hélice de doble cadena que ensambla las moléculas de actina G [47]. El filamento de actina F viene en unidades repetidas de 13 moléculas de actina G [34].

Como ya se mencionó, el filamento de actina también consta de moléculas de tropomiosina y troponina, conocidas por desempeñar un papel regulador en la contracción

(Figura 2.4 D). Las moléculas de tropomiosina están compuestas por dos estructuras enrolladas en forma de varilla, de 2 nm de diámetro y 40 nm de largo, y cada una de estas moléculas se une a siete moléculas de actina G [34, 47]. Por su parte, las moléculas de troponina se unen a las varillas de tropomiosina a intervalos regulares [34], y están conformadas por tres complejos separados según su afinidad: troponina C (TnC), troponina I (TnI) y troponina T (TnT) [51]. La troponina C es el complejo de unión al Ca^{2+} , la troponina I es el componente inhibidor y la troponina T es el complejo que se une a la tropomiosina [47]. Por último, para el caso de la molécula de nebulina, no se conoce de manera exacta su función y ubicación dentro del filamento de actina; sin embargo, se cree que puede estar involucrada en la regulación del ensamblaje de la actina F y la longitud del filamento [34].

2.1.3. Unión neuromuscular

Los músculos esqueléticos se encuentran inervados por neuronas motoras mielinizadas grandes, conocidas como motoneuronas, que provienen del asta gris anterior de la médula espinal o de los núcleos del tronco encefálico [34]. Por lo general, una fibra muscular es inervada por una sola neurona motora (Figura 2.5 A), sin embargo, una neurona motora puede llegar a inervar hasta más de mil fibras, dependiendo de la función que realice el músculo esquelético completo [51]. La asociación de la neurona motora y las fibras musculares comprende desde 100 hasta 1000 fibras [51]. El sitio donde la neurona motora ingresa al músculo se denomina punto motor o unidad motora (Figura 2.5 B), en este lugar el axón de la neurona motora se ramifica para suministrar terminales en las uniones neuromusculares ubicadas en la parte media de las fibras musculares [34]. Las fibras musculares presentan una sola unión neuromuscular, la cual funciona mediante sinapsis colinérgica por medio del neurotransmisor acetilcolina (ACh) y sinapsis *en passant* al presentarse varios contactos a la vez sobre una misma fibra muscular [51, 54].

La región del sarcolema que se encuentra directamente debajo de la terminación axonal se denomina placa terminal motora; cerca de esta placa, la neurona motora pierde su cubierta de mielina y el axón se divide en prolongaciones cortas que penetran parcialmente sus canales sinápticos [34]. Las prolongaciones cortas contienen botones sinápticos cubiertos por una capa delgada de células de Schwann; estos botones sinápticos contienen vesículas llenas del neurotransmisor ACh [51]. Las células de Schwann son el principal tipo de células gliales del sistema nervioso periférico y pueden clasificarse en dos tipos: células

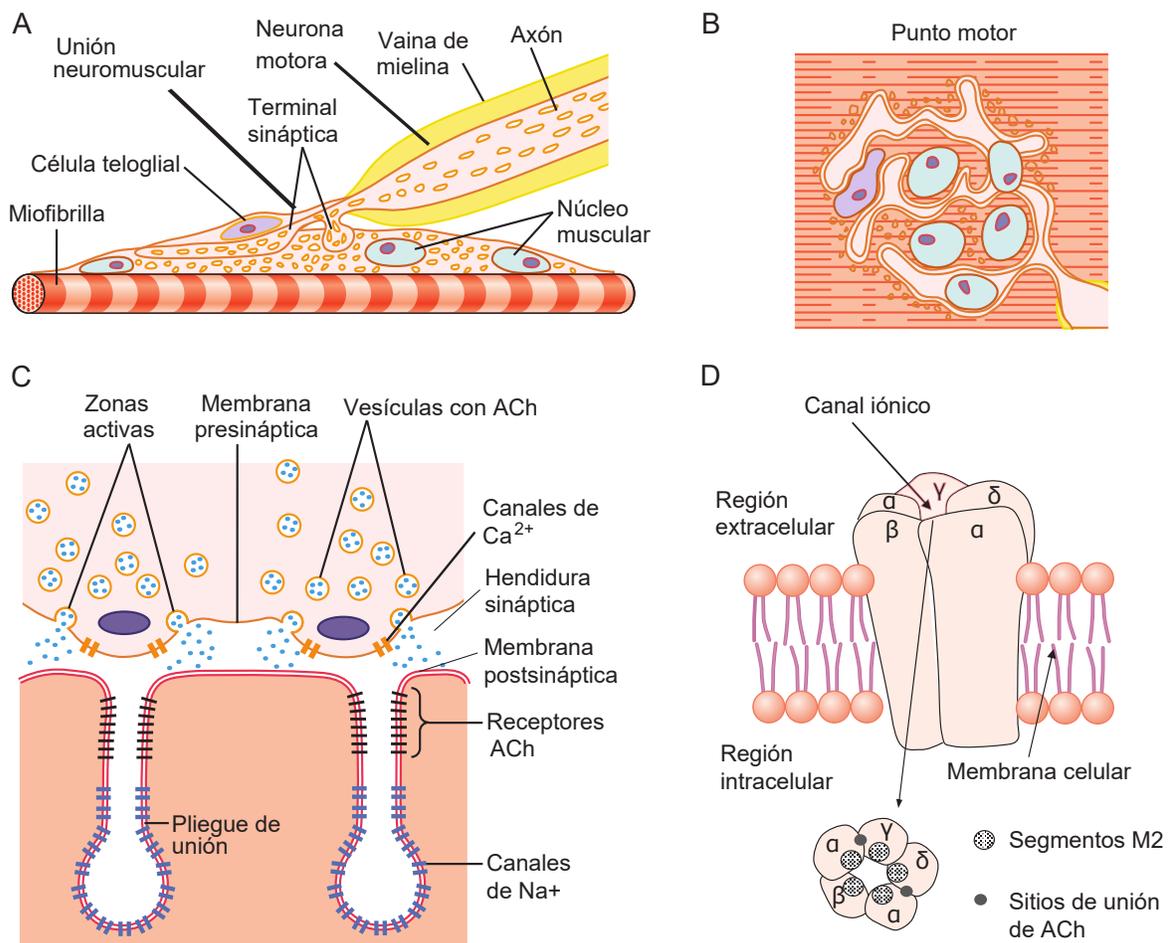


Figura 2.5: Unión neuromuscular y canales receptores nicotínicos de acetilcolina. Esquemas representativos de la unión neuromuscular (A), el punto motor (B), la liberación de ACh desde las vesículas sinápticas hacia la membrana neural (C) y el canal receptor nAChR (D). Figura adaptada de [34, 47, 53].

mielinizantes y no mielinizantes [55]. Las células de Schwann mielinizantes proporcionan el revestimiento de mielina de todos los axones periféricos de gran diámetro, mientras que las células de Schwann no mielinizantes se encuentran presentes en axones más pequeños de tal manera que envuelve varios axones [55].

El espacio entre la placa terminal y los terminales sinápticos se denomina hendidura sináptica y consiste en una separación de 20 a 30 nm llena de líquido extracelular [47]. La placa terminal presenta pliegues de unión con forma de invaginaciones los cuales contienen canales de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) que transmiten el estímulo nervioso hacia la fibra muscular (Figura 2.5 C) mediante el paso de Na^+ y K^+ [48, 51].

Los receptores nicotínicos de acetilcolina son canales activados por ligandos que tienen un diámetro aproximado de 0.65 nm [34, 47]. Los receptores (nAChR) en la placa terminal constan de cinco subunidades distribuidas simétricamente alrededor del eje perpendicular a la membrana (Figura 2.5 D): 2 α , 1 β , 1 δ y 1 γ [47]. Cada subunidad contiene cuatro segmentos M1, M2, M3 y M4 que cruzan la membrana, formando dos dominios: un dominio extracelular y un dominio citoplasmático [34]. Los sitios de unión de ACh se ubican entre las subunidades α/δ y α/γ (Figura 2.5 D). La entrada del canal nAChR se forma con cinco segmentos M2, los cuales se alinean conjuntamente formando un anillo hidrofóbico que mantiene cerrado el canal en ausencia de ACh [34].

2.1.4. Excitación y contracción muscular

2.1.4.1. Teoría de puentes cruzados

La teoría de puentes cruzados intenta describir el mecanismo molecular de la contracción muscular, basándose en la hipótesis de la existencia de un acople entre los filamentos de actina y las cabezas de los filamentos de miosina, lo que produce una fuerza neta de deslizamiento [47]. Para entender completamente el mecanismo de excitación y contracción muscular es necesario describir todo el proceso de estimulación muscular. En primer lugar, un potencial de acción viaja a lo largo del axón de la neurona motora, este a su vez, estimula otro potencial de acción a través del sarcolema de la fibra muscular [34]. La despolarización de la membrana terminal del axón presináptico permite la apertura de canales en la terminal del axón; los iones Ca^{2+} inducen la liberación de ACh en la hendidura sináptica desde los botones terminales, esto ocurre mediante la exocitosis que experimentan los botones terminales al fusionarse con la membrana terminal sináptica [47]. Una vez en la hendidura sináptica, la ACh se difunde hacia la región de la placa terminal motora, donde se une a los canales nAChR incrustados en la membrana de la placa terminal (Figura 2.5 C). La unión de las moléculas de ACh causa un cambio conformacional en el arreglo de segmentos M2 (Figura 2.5 D), abriendo el canal y permitiendo el flujo de iones de Na^+ hacia el interior del canal y K^+ hacia el exterior [34, 47, 48]. El flujo de iones de sodio y potasio provoca la despolarización de la placa terminal motora, dando como resultado la apertura de canales de sodio dependientes de voltaje y la generación de un potencial de acción muscular [47, 51].

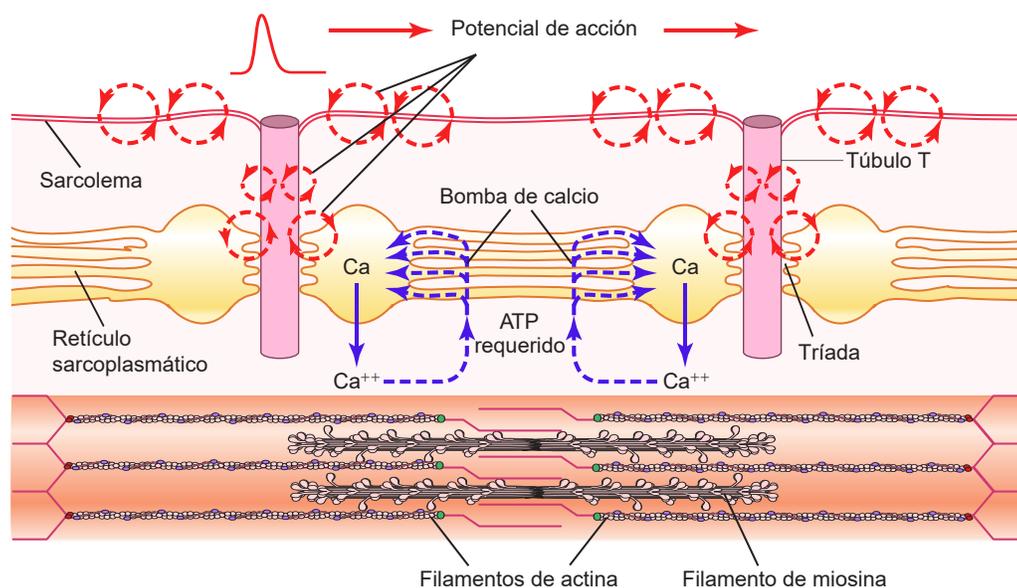


Figura 2.6: Acoplamiento de excitación y contracción en el músculo esquelético. Se observa un potencial de acción que provoca la liberación de iones de calcio del retículo sarcoplásmico y la recaptación de los iones de calcio por una bomba de calcio. Figura adaptada de [47, 53].

En la célula muscular, el retículo sarcoplásmico permite la transmisión del impulso nervioso a los miofilamentos de la fibra muscular (Figura 2.6). El potencial de acción de la placa motora viaja por todo el sarcolema a lo largo de la red formada por los túbulos T y las cisternas terminales [48, 51]. En la fibra muscular, el calcio se difunde por el retículo sarcoplásmico hasta alcanzar las cisternas terminales donde es almacenado; posteriormente, el calcio es liberado al sarcoplasma mediante el potencial de acción [47]. Una vez que los iones Ca^{2+} se encuentran en el sarcoplasma, se unen a los dominios de la subunidad TnC, provocando cambios conformacionales en el filamento de actina, lo cual permite que las cabezas de miosina se unan a los sitios activos en las moléculas de actina G, conforme se transloca el complejo troponina-tropomiosina [34], dando inicio al ciclo de puentes cruzados (Figura 2.7). La subunidad TnT mantiene unida la troponina a los filamentos de actina F uniéndose tanto a TnI como a tropomiosina [47]. Por otra parte, la presencia de calcio también permite que las cabezas de miosina cambien de posición por medio de la hidrólisis del ATP a $ADP + P_i$ (Figura 2.7), este proceso también es entendido como un cambio conformacional de la molécula de miosina, haciendo que la cabeza de miosina se extienda perpendicularmente hacia el filamento de actina, lo que se conoce como golpe de fuerza [34, 53]. La contracción es producida por el golpe de fuerza que tira los filamentos de actina hacia la línea M del sarcómero; en ese punto, las cabezas de miosina

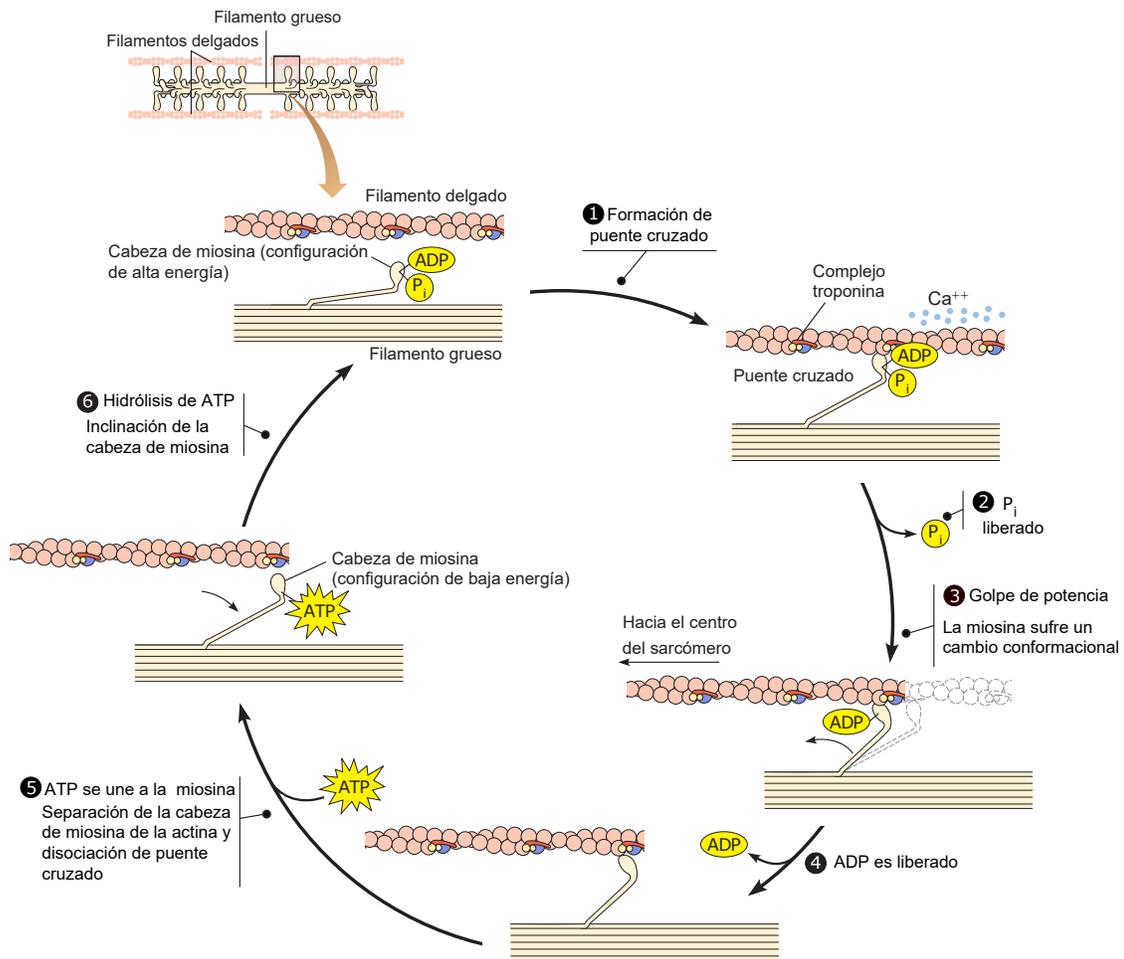


Figura 2.7: Proceso cíclico de puentes cruzados durante la contracción muscular. Se ilustra la serie de eventos en los que el puente cruzado, formado por una cadena pesada de miosina, atrae el filamento delgado hacia el centro del sarcómero, lo que hace que la miofibrilla se contraiga. Figura adaptada de [53].

liberarán el $ADP+P_i$ hacia el sarcoplasma. Los puentes cruzados permanecerán unidos a la actina hasta que una molécula de ATP se una nuevamente a las cabezas de miosina, momento en el cual los puentes cruzados se separan [34, 51, 53]. El ciclo se repetirá siempre que exista calcio presente en el sarcoplasma y ATP para separar la actina y la miosina.

2.1.4.2. Mecánica de la fibra muscular

En condiciones normales, la longitud de un sarcómero oscila entre 1.6 y 2.6 μm [34]. Durante la contracción, un sarcómero individual puede acortarse una distancia aproximada de 2 μm ; sin embargo, el acortamiento puede variar dependiendo de la longitud del

sarcómero en reposo al comienzo de la contracción [34, 47]. Para el caso de la fibra muscular, la cantidad de acortamiento dependerá del número de sarcómeros en serie a lo largo de la miofibrilla, ya que la contracción total es el resultado de la suma de los acortamiento de todos los sarcómeros; por otro lado, la cantidad de fuerza generada por una fibra muscular durante la contracción es proporcional al número de puentes cruzados o golpes de fuerza producidos en los filamentos de miosina y actina [34]. La fuerza contráctil máxima se logra en longitudes de sarcómero entre 2.0 y 2.2 μm (Figura 2.8 A) y se cree que en estas longitudes todas las cabezas de miosina forman puentes cruzados con los sitios activos de la molécula de actina, evitando que los filamentos de actina se superpogan [47]. Los casos extremos suceden cuando las longitudes de sarcómero son muy pequeñas o muy grandes. Si se realiza un acortamiento pronunciado, los filamentos de miosina entrarán en contacto con las líneas Z de los sarcómeros, impidiendo un mayor acortamiento y disminuyendo la fuerza generada hasta cero [34, 47]. Por el contrario, si el estiramiento es prolongado, el sarcómero se estirará hasta el punto en que ningún puente cruzado de miosina encuentre un sitio activo de actina, provocando que la fuerza generada por el músculo también se reduzca a cero (Figura 2.8 A) [42].

El análisis de la mecánica muscular también puede realizarse considerando el tiempo de contracción durante una sola estimulación (Figura 2.8 B). En este caso se pueden diferenciar cuatro fases en la contracción muscular: una fase inicial de aplicación del estímulo, un período de latencia, una fase de contracción y una fase de relajación [42, 48]. La fase inicial de estímulo corresponde a la despolarización de la placa terminal motora. El período de latencia dura aproximadamente 2 ms y es independiente de la duración completa de la contracción [34]; durante este periodo, el potencial de acción viaja a través del sarcolema hacia el interior de la fibra muscular, liberando calcio desde el retículo sarcoplásmico hacia el sarcoplasma y provocando la contracción de los sarcómeros. La fase de contracción, por otra parte, se produce cuando la contracción de los sarcómeros provoca una tensión medible, la cual presenta un comportamiento creciente hasta alcanzar un máximo de fuerza de contracción [48]. La duración de las contracciones varía dependiendo de cada músculo y su rango de tiempo oscila entre 7 y 100 ms [34]. Una vez alcanzada la fuerza de contracción máxima, comienza la fase de relajación, que se caracteriza por la disminución de los niveles de calcio en el sarcoplasma, debido a la reabsorción de calcio hacia el retículo sarcoplásmico [34, 51]. La reducción en el calcio implica una disminución de los sitios activos disponibles en el filamento de actina, lo cual conlleva a la reducción de la fuerza de contracción [34].

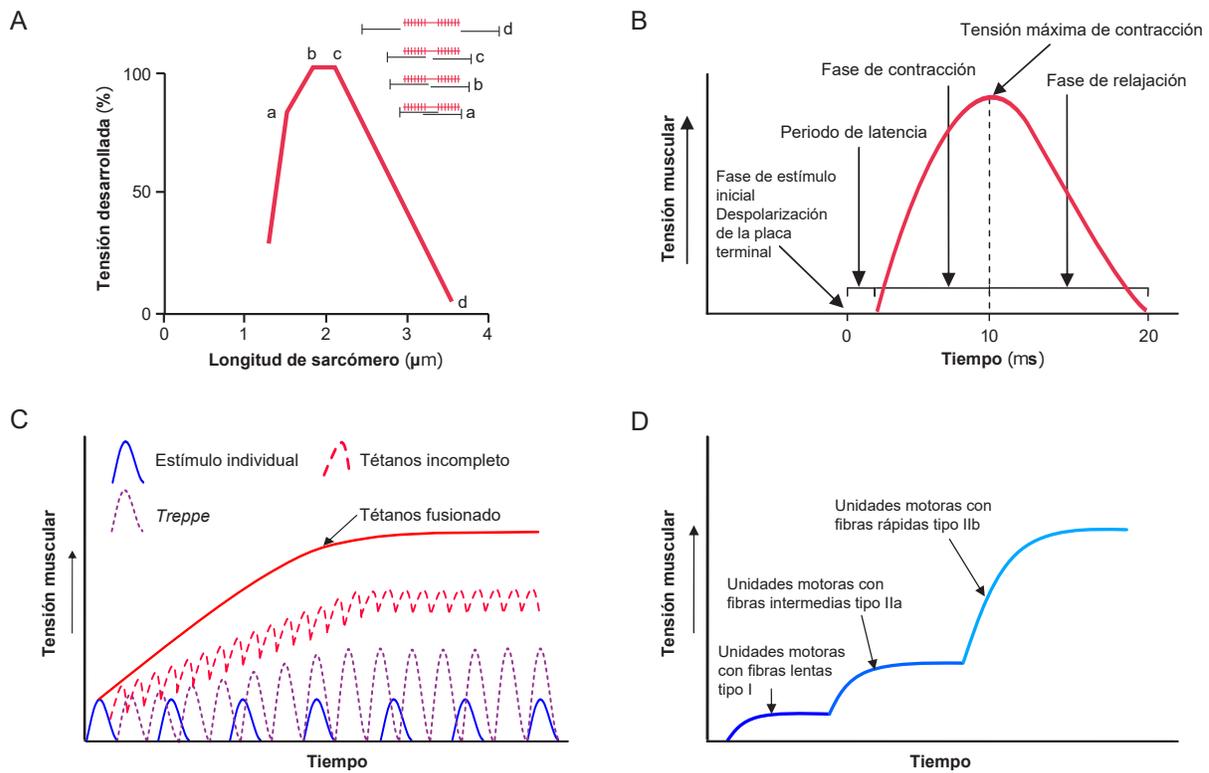


Figura 2.8: Mecánica de la fibra muscular: diagrama de tensión en función de la longitud de sarcómero durante la contracción (A), fases de la contracción muscular durante una sola estimulación para un músculo rápido (B), tensiones de contracción hasta alcanzar la sumación (C) y reclutamiento de unidades motoras en la contracción muscular (D). Figura adaptada de [34, 47].

Por lo general, la fase de relajación en una contracción de un solo estímulo dura más que la fase de contracción [42].

Otra forma de estudiar las propiedades mecánicas del músculo esquelético es mediante la realización de estimulaciones repetidas (Figura 2.8 C). Si las estimulaciones son aplicadas a intervalos de tiempo adecuados puede producirse un efecto de sumación de la fuerza de contracción muscular [47, 48]. Cuando las estimulaciones individuales se repiten a intervalos de tiempo muy separados, la fibra muscular regresará a su estado de reposo normal, lo que ocasiona que el fenómeno de sumación no se produzca. Si la fibra muscular es estimulada al terminar su fase de relajación, cada contracción consecutiva aumentará en intensidad hasta alcanzar una fuerza máxima, produciendo un efecto tipo escalera, también conocido como *treppe* [34, 47]. Si las estimulaciones son realizadas durante las fases de relajación, también se observará un aumento de la fuerza para cada contracción, hasta que

se alcanza un nivel máximo; en este caso, el fenómeno es conocido como tétanos incompleto y se debe a la suma de las fuerzas de contracción consecutivas, aunque se presentan disminuciones parciales entre las respuestas mecánicas sucesivas [48]. Por último, cuando la fibra muscular recibe un nuevo estímulo antes de que comience su fase de relajación el patrón de tétanos incompleto desaparece, produciendo una curva de fuerza suave que se eleva hasta alcanzar una meseta, este comportamiento es conocido como tétanos fusionado [34, 47]. La frecuencia de estimulación a la cual aparece el tétanos fusionado se conoce como frecuencia tetánica y la tensión de contracción alcanzada en la meseta es la fuerza tetánica. El tétanos fusionado ocurre en un rango de frecuencias de 20 Hz a 60 Hz para la mayoría de los músculos esqueléticos de mamíferos; estimular el músculo con frecuencias mayores a la frecuencia tetánica no produce aumentos significativos en la tensión [34]. No obstante, la contracción intensa y prolongada en los músculos esqueléticos conduce inevitablemente a la fatiga muscular, la cual está caracterizada por la disminución sostenida de la fuerza de contracción. El proceso de contracción prolongado provoca, entre otras cosas, una interrupción del flujo sanguíneo en los músculos esqueléticos, lo cual conduce a la fatiga muscular casi completa en pocos minutos, debido a la pérdida del suministro de nutrientes y oxígeno en las fibras musculares [47]. La fatiga, por lo tanto, es el resultado de la incapacidad de los procesos contráctiles y metabólicos de las fibras musculares para continuar proporcionando la misma producción de fuerza de contracción [47].

Otro fenómeno que se produce durante estimulaciones repetidas es el reclutamiento (Figura 2.8 D). Cuando el sistema nervioso envía señales débiles para contraer un músculo, las unidades motoras pequeñas del músculo son estimuladas con preferencia a las unidades motoras grandes [47]. Las unidades motoras pequeñas comprenden pocas fibras musculares de diámetro pequeño, mientras que las unidades motoras grandes abarcan una mayor cantidad de fibras musculares de diámetro mayor. Conforme la intensidad de la señal aumenta, comienzan a excitarse unidades motoras más grandes aumentando la fuerza de contracción, ya que las unidades motoras grandes provocan mayores fuerzas contráctiles que las unidades pequeñas. Este mecanismo de reclutamiento, basado en el tamaño de las unidades motoras, recibe el nombre de *principio del tamaño* [42, 47]. Este fenómeno es importante porque permite gradaciones en pequeños pasos de la fuerza muscular durante la contracción débil, mientras que los pasos se vuelven progresivamente mayores cuando se requieren grandes cantidades de fuerza [34, 47]. La causa del reclutamiento es que las unidades motoras más pequeñas son impulsadas por pequeñas fibras nerviosas motoras,

que tienen axones cortos que inervan pocas fibras musculares; por lo tanto, resultan más excitables que las fibras nerviosas grandes, caracterizadas por axones largos que inervan una mayor cantidad de fibras musculares [48]. El músculo, por lo general, contiene diferentes tipos de unidades motoras entremezcladas; sin embargo, las fibras musculares dentro de una misma unidad motora presentan un solo tipo de propiedades contráctiles. Las unidades motoras pequeñas contendrán fibras de contracción lenta (tipo I), las unidades motoras intermedias consistirán en fibras de contracción intermedia (tipo IIa) y las unidades motoras grandes presentarán fibras de contracción rápida (tipo IIb) [34]. Una explicación más detallada de los tipos de fibras musculares se muestra más adelante en la Sección 2.1.5.

2.1.5. Tipos de fibras musculares

Las fibras musculares pueden clasificarse de acuerdo a sus características histoquímicas, morfológicas, bioquímicas y fisiológicas. Basándose en las características fisiológicas de la generación de fuerza de contracción, las fibras musculares se pueden clasificar en fibras lentas (tipo I) y fibras rápidas (tipo II) [52]. Otros autores han realizado clasificaciones más específicas, incluyendo una categoría intermedia y definiendo tres tipos de fibras: fibras musculares lentas (tipo I), fibras musculares intermedias (tipo IIa) y fibras musculares rápidas (tipo IIb) [34]. Varias de las características de las fibras intermedias se encuentran entre las fibras rápidas y las fibras lentas, por lo que resulta eficiente comparar únicamente las características de las fibras rápidas y las fibras lentas (Tabla 2.1). Por otra parte, existen sistemas de clasificación que combinan las propiedades fisiológicas y metabólicas de las fibras musculares, refiriéndose a las actividades de enzimas oxidativas⁷ y glucolíticas⁸ en los músculos lentos y rápidos; bajo este sistema combinado, las fibras musculares se categorizan de la siguiente manera: fibras lentas oxidativas (SO, por sus siglas en inglés), fibras glucolítico-oxidativas rápidas (FOG, por sus siglas en inglés) y fibras glucolíticas rápidas (FG, por sus siglas en inglés) [52]. Casi todos los músculos están compuestos tanto de fibras rápidas como de fibras lentas y, dependiendo de la mayoría de fibras que tenga, es de donde se obtiene su clasificación.

⁷Las enzimas oxidativas funcionan mediante mecanismos de reacción de oxidación-reducción para introducir oxígeno o eliminar electrones en compuestos orgánicos [56].

⁸Las enzimas glucolíticas participan en el proceso celular de glucólisis, que convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, produciendo ATP y NADH [57].

Tabla 2.1: Comparación de las características de las fibras musculares lentas y rápidas.

Características	Fibras lentas	Fibras rápidas
Síntesis primaria de ATP	Aeróbica Fosforilación oxidativa	Anaeróbica Glucólisis
Frecuencia tetánica	Baja	Alta
Velocidad de contracción	Lenta	Rápida
Diámetro de las fibras	Pequeñas	Grandes
Densidad de miofilamentos	Similar a las fibras rápidas	Similar a las fibras lentas
Fuerza desarrollada	Pequeña	Grande
Capilares	Muchos	Pocos
Mitocondrias	Muchas	Pocas
Color	Rojo	Blanco
Mioglobina	Alta	Baja
Tasa de fatiga	Resistente a la fatiga	Susceptible a la fatiga
Ciclo de puentes cruzados	Lento	Rápido
Actividad ATPasa	Lenta	Rápida
Almacenamiento de glucógeno	Bajo	Alto
Bombeo de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático	Moderado	Alto

Tabla tomada de [34].

2.1.5.1. Fibras lentas (tipo I)

Las fibras musculares lentas presentan pequeños diámetros de fibra y están inervadas por fibras nerviosas pequeñas; no obstante, el sistema de vasos sanguíneos y capilares en estas fibras es extenso con el fin de suministrar cantidades grandes de oxígeno [34]. Este tipo de fibras poseen un alto contenido mitocondrial, lo que les proporciona altos niveles de metabolismo oxidativo; además, también contienen grandes cantidades de mioglobina, proteína que contiene hierro similar a la hemoglobina en los glóbulos rojos [47]. La mioglobina es la proteína muscular que le da la coloración rojiza al músculo esquelético, es por este motivo que los músculos con mayor porcentaje de fibras lentas tienen un aspecto muy rojizo, lo que les da el nombre de músculos rojos [34]. Además, la mioglobina se combina con el oxígeno presente en las fibras musculares y lo almacena hasta que el músculo lo necesite; esto también acelera enormemente el transporte de oxígeno hacia las mitocondrias [47]. Por otra parte, la actividad ATPasa en las fibras lentas es pequeña, por lo que la velocidad de contracción y la fuerza muscular también son pequeñas para estas fibras; sin embargo, los tiempos en los que se alcanza la fuerza máxima y la relajación son grandes, lo que se traduce en pequeñas velocidades de acortamiento para todo el músculo y una mayor resistencia a la fatiga muscular (Tabla 2.1) [34].

2.1.5.2. Fibras rápidas (tipo II)

Las fibras musculares rápidas presentan diámetros más grandes que las fibras lentas, por lo que el número de miofilamentos en las fibras rápidas es mayor; no obstante, a pesar de que existen más miofilamentos en las fibras rápidas, la densidad promedio de miofilamentos en las secciones transversales no difiere significativamente, comparándolas con las fibras lentas [34]. Los diámetros de las fibras se correlacionan con la fuerza que desarrollan los músculos, en consecuencia, las fibras rápidas son capaces de generar mayor fuerza de contracción [34, 47]. También se ha comprobado que la velocidad de contracción, la rapidez en la que se alcanza la fuerza máxima, la tasa de relajación y la frecuencia tetánica son mayores para las fibras rápidas; esto se debe a que las fibras rápidas poseen un retículo sarcoplásmico extenso para la liberación rápida de iones de calcio, además de grandes cantidades de enzimas glucolíticas para una rápida liberación de energía mediante el proceso glucolítico [47]. En cuanto al suministro de sangre, se ha observado una menor cantidad de capilares en las fibras rápidas, lo que significa que el metabolismo oxidativo es un proceso secundario en este tipo de fibras [34]. Además, las fibras rápidas contienen una menor cantidad de mitocondrias y un bajo contenido de mioglobina, lo que hace que los músculos con un alto porcentaje de fibras rápidas presenten una coloración más pálida, que a menudo es considerada como una coloración blanca [47]. En lo referente al ciclo de puentes cruzados, determinado por la actividad ATPasa en las cabezas de miosina, se tiene que las fibras rápidas presentan un ciclo hasta cuatro veces mayor que las fibras lentas, lo que implica mayores velocidades de acortamiento de todo el músculo, pero también conlleva a una mayor susceptibilidad a la fatiga muscular (Tabla 2.1) [34].

2.2. Músculo en condiciones especiales

2.2.1. Entrenamiento muscular

Cuando se realiza ejercicio físico, las unidades motoras de los músculos se reclutan en orden, siendo las primeras en activarse las unidades motoras pequeñas de contracción lenta, seguidas por las intermedias y, por último, las unidades motoras grandes de contracción rápida (Figura 2.8 D). Este mecanismo de reclutamiento, basado en el *principio del tamaño* tiene implicaciones en el orden de reclutamiento de las fibras musculares, empezando por la activación de las fibras musculares lentas tipo I y finalizando con las fibras musculares

rápidas tipo II [42]. El orden de reclutamiento también determina el orden de potencia en los músculos esqueléticos, siendo las unidades motoras fatigables con fibras tipo II las que producen una mayor fuerza [34].

De manera general, se puede clasificar el entrenamiento muscular en ejercicios de hipertrofia y ejercicios de resistencia. En el caso de la hipertrofia, el entrenamiento es enfocado en el aumento de tamaño de los músculos, mediante la realización de ejercicios que modifiquen principalmente a las fibras rápidas, ocasionando un incremento en el diámetro de las fibras musculares existentes. Específicamente, la hipertrofia es generada por un aumento en el número de filamentos de actina y miosina en la fibra muscular, incorporando miofilamentos adicionales a las miofibrillas existentes, lo que da lugar a fibras musculares de mayor diámetro y un aumento de la fuerza de contracción [34]. Por el contrario, los entrenamientos de resistencia producen una ligera disminución en el diámetro de las fibras musculares; además, existe evidencia de que los ejercicios de resistencia provocan una conversión entre diferentes tipos de fibras dependiendo del músculo estudiado, por ejemplo, la conversión de las fibras tipo IIb a fibras tipo IIa [58–60]. Otros autores han reportado sobreexpresión en proteínas señalizadoras, o bien una tendencia creciente en cuanto al número de capilares por fibra después de realizar entrenamientos de resistencia [61, 62], lo que indica la formación de nuevos capilares dentro del músculo; esto es consistente con el proceso de conversión de fibras rápidas a lentas, lo cual también implica una reducción del ciclo de puentes cruzados, menor actividad ATPasa, menores velocidades de acortamiento de los sarcómeros y una menor susceptibilidad a la fatiga muscular [63].

2.2.1.1. Entrenamiento por intervalos de alta intensidad

Los entrenamientos por intervalos de alta intensidad (HIIT, por sus siglas en inglés) comprenden intervalos de ejercicio intenso alternados con períodos de menor intensidad para la recuperación; estas modalidades de entrenamiento son conocidas por proporcionar efectos fisiológicos en menos tiempo que los regímenes de ejercicio tradicionales [27]. Existe una gran variedad de protocolos de entrenamiento HIIT, pero todos se caracterizan por períodos de ejercicio continuo intenso, intercalados con periodos de descanso activo. Las modalidades de entrenamiento HIIT pueden emplearse tanto para estimular la hipertrofia muscular como para desarrollar resistencia en los músculos. De hecho, algunos autores han reportado un aumento de la resistencia a la fatiga inducido por HIIT, vinculándolo con una mejora en el contenido y la función de las mitocondrias [64, 65]; mientras que otros

investigadores demostraron que ciertos entrenamientos HIIT provocan una mayor activación de las fibras musculares tipo II [66, 67], dándoles un mayor potencial de hipertrofia, desarrollo de masa muscular y mayor área de sección transversal de las fibras musculares [27, 68]. Por este motivo, el efecto de los entrenamientos HIIT sobre la masa y la composición muscular sigue siendo controversial, lo que dificulta establecer un programa de ejercicio específico en términos de tipo, intensidad, frecuencia y duración [69].

A pesar de la controversia, existe una gran cantidad de investigaciones que analizan las respuestas adaptativas de los músculos esqueléticos a diversos protocolos HIIT, tanto para el ámbito preclínico como para el clínico. La mayoría de reportes coinciden en que los protocolos HIIT mejoran la capacidad aeróbica de los músculos, aumentando el contenido mitocondrial en las fibras musculares y disminuyendo la susceptibilidad a la fatiga [65, 70]. No obstante, es importante mencionar que los efectos de los entrenamientos a intervalos de alta intensidad no son iguales para todos los tipos de músculo; de hecho, los cambios celulares y metabólicos que experimentan los músculos esqueléticos por medio del HIIT dependen del tipo de fibras musculares que conforman los músculos y del tipo de entrenamiento que se aplica [63, 64, 66]. Según el principio del tamaño, no todas las fibras musculares son activadas al mismo tiempo durante el HIIT, las primeras fibras en activarse serán las fibras tipo I, seguidas de las fibras tipo IIb, hasta terminar con la activación de las fibras tipo IIa, conforme la intensidad del entrenamiento HIIT lo requiera [42, 63]. En consecuencia, es posible diseñar protocolos HIIT que afecten en mayor medida a un tipo específico de fibras musculares, modificando los intervalos de alta intensidad, los intervalos de descanso activo, el número de sesiones y la periodicidad de los entrenamientos. Dependiendo de los intereses de cada investigador, se puede establecer protocolos que estimulen mayoritariamente a las fibras lentas, en el caso de los HIIT de resistencia, o a las fibras rápidas, en el caso de los HIIT de fuerza e hipertrofia.

En particular, en el caso de los HIIT de resistencia, también se ha verificado la existencia de respuestas específicas dependientes del tipo de fibras que contienen los músculos entrenados. En los músculos enriquecidos con fibras tipo II, los HIIT de resistencia provocan un aumento en la biogénesis mitocondrial⁹, mediada por la vía AMPK, PGC-1 α , SIRT1 y ROS, así como por la modulación de la homeostasis del Ca²⁺ [63]. También producen un incremento en la expresión de ciertas enzimas y proteínas que participan en

⁹La biogénesis mitocondrial es un proceso de autorrenovación celular, mediante la cual se generan nuevas mitocondrias a partir de las ya existentes [71].

la homeostasis metabólica, con lo cual se puede inducir la conversión de fibras tipo II a tipo I [63]. Para los músculos conformados mayoritariamente por fibras tipo I, los HIIT de resistencia provocan modificaciones en el metabolismo energético, aumentando significativamente las relaciones celulares ADP/ATP y AMP/ATP que pueden activar AMPK, uno de los sensores de energía más importantes de las células; esto puede significar un aumento en los ciclos de puentes cruzados, aumentando la fuerza de contracción en estos músculos, además, el aumento en el contenido mitocondrial contribuye al rendimiento de resistencia, permitiendo que los músculos ahorren glucógeno durante el ejercicio [63, 70].

2.2.2. Atrofia por inmovilización

La atrofia del músculo esquelético puede tener causas de naturaleza fisiológica o patológica. Las causas fisiológicas se originan principalmente en situaciones de ejercicio reducido, mientras que la atrofia patológica se produce por enfermedades o padecimientos que afectan la homeostasis celular en los músculos esqueléticos. Entre estas enfermedades se puede mencionar el daño nervioso, los accidentes cerebrovasculares, la caquexia por cáncer, la diabetes mellitus, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el ayuno extremo [35, 72, 73]. Tanto las causas fisiológicas como las patológicas afectan el mantenimiento de la homeostasis en el músculo esquelético, es decir, producen un desequilibrio de las interacciones entre las proteínas, los iones y las moléculas presentes en las fibras musculares, afectando su estructura y función. Los cambios en la dinámica celular de las fibras musculares, causados por la alteración de la homeostasis, también activan respuestas celulares compensatorias que intentan restaurar el equilibrio original en las células musculares [74]. No obstante, si el microambiente celular continúa cambiando, se romperá completamente la homeostasis, provocando la atrofia del músculo esquelético.

La atrofia del músculo esquelético es un problema muy frecuente en personas que han sido sometidas a la inmovilización de alguna de sus extremidades [8]. El desuso de los músculos, derivado de la inmovilización, induce los cambios celulares en las fibras musculares, lo que resulta en la pérdida significativa de la producción de fuerza y la masa muscular [8, 18]. La inmovilización muscular puede afectar tipos específicos de fibras y con frecuencia está acompañada por un proceso de conversión entre estas. De hecho, se ha demostrado que el desuso muscular afecta en mayor medida a los músculos esqueléticos altamente enriquecidos por fibras oxidativas lentas (tipo I), con un cambio de tipo de fibra lento a rápido [75–77]. Los principios generales de la atrofia muscular dictan que las fibras

musculares de contracción lenta se atrofian antes que las fibras musculares de contracción rápida, y que los músculos esqueléticos inmovilizados en posiciones acortadas tienen mayores reducciones que los inmovilizados en posición alargada [75]. Los mecanismos específicos por los cuales la inmovilización induce los cambios musculares están asociados a la degradación de proteínas en el músculo esquelético, como las cadenas pesadas y ligeras de miosina, o a la disminución en la tasa de síntesis de proteínas [18].

El músculo esquelético presenta, por lo menos, tres procesos proteolíticos de degradación: el sistema dependiente de Ca^{2+} , el sistema ubiquitina (Ub)-proteasoma (UPS, por sus siglas en inglés) y el sistema autofagia-lisosoma (ALS, por sus siglas en inglés) [18]. El sistema dependiente de Ca^{2+} incluye dos cisteína proteasas ubicuas, μ -calpaína y m-calpaína, y su inhibidor endógeno específico, la calpastatina, que desempeñan un papel importante en la degradación de las proteínas musculares cuando se altera la homeostasis del Ca^{2+} citosólico [78]. El sistema ubiquitina (Ub)-proteasoma se describe como un conjunto de acciones ordenadas de enzimas que etiquetan a la mayoría de las proteínas intracelulares para su degradación [79]; entre estas enzimas se encuentran las Ub-ligasas, Atrogin-1/MAFbx y MuRF1, las cuales se encargan de unir cadenas de Ub a las proteínas durante la atrofia muscular, lo que conduce al reconocimiento y degradación de proteínas ubiquitinadas por el proteasoma [18]. Por último, el sistema autofagia-lisosoma es el principal responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas agregadas y los organelos celulares; este proceso de degradación se produce mediante la formación del autofagosoma, que envuelve los sustratos y los entrega al lisosoma para su descomposición [80]. Por otro lado, existen estudios que han demostrado que el exceso de especies reactivas de oxígeno en los músculos esqueléticos ocasiona lesiones por estrés oxidativo y un aumento considerable de la producción de factores inflamatorios, lo cual propicia el incremento de la proteólisis y la disminución de la síntesis de proteínas musculares [81, 82]. La evidencia demuestra que la inflamación es un factor impulsor de la atrofia muscular, ya que los factores inflamatorios activan una serie de vías de señalización que suprimen la síntesis de proteínas musculares, sobreactivando la proteólisis y causando trastornos metabólicos que afectan la masa muscular [35]. La contribución de los factores inflamatorios y los sistemas proteolíticos en la atrofia muscular ha sido analizada en varios modelos experimentales de inmovilización en murinos, revelando parte de los procesos moleculares involucrados en la atrofia muscular y demostrando el papel de estos mecanismos en la regulación de la plasticidad muscular durante la inmovilización [18, 75, 83].

2.3. Ratones de laboratorio C57BL/6J

Las principales razones por las que se usan este tipo de ratones en la investigación incluyen: tamaño pequeño, facilidad de manejo, bajos costos de mantenimiento, corto tiempo de generación de nuevas camadas, alta fecundidad, rápida maduración, poblaciones genéticamente homogéneas y 95 % de homología genética¹⁰ con humanos, que incluye homologías en las enfermedades genéticas¹¹ y fenotípicas¹² entre ratones y humanos [87, 88].

2.3.1. Características fisiológicas y conductuales

En condiciones *ad libitum*, los ratones tienen una esperanza de vida aproximada de 790 días [89, 90]. Su ciclo de vida puede dividirse en cinco etapas principales de desarrollo: la fase prenatal, la fase posnatal temprana, la adolescencia, la edad adulta y la vejez [7]. La fase prenatal en los ratones dura aproximadamente 19 días, desde el momento de la concepción hasta el nacimiento [7]. El período postnatal temprano termina entre los 21 a 25 días después del nacimiento, en este periodo se realiza la finalización del destete y el ratón adquiere independencia de su madre [7]. El periodo de adolescencia puede durar entre 25 y 35 días, empieza entre los 22 y 34 días después del nacimiento y termina con la maduración sexual entre los 48 y 60 días, donde empieza la edad adulta [7]. El comienzo de la vejez empieza con el inicio de la fase posreproductiva, algunas cepas de ratones son fértiles hasta que alcanzan una edad aproximada de 700 días; sin embargo, también se ha observado una reducción significativa del periodo fértil cuando los ratones se cruzaron durante una generación, alcanzando únicamente los 570 días [7].

La mayor parte de la actividad del ratón ocurre durante la oscuridad, esto incluye su alimentación y actividades físicas [89]. La estructura del reloj circadiano de los ratones comprende un periodo de luz y oscuridad de 12 horas (12L:12D) [91]. Los factores ambientales y el hacinamiento pueden afectar la conducta de los ratones, influyendo en los resultados de los estudios realizados sobre ellos. De hecho, en las cepas C57BL/6J alojadas en conjuntos de 10 animales por jaula, en comparación con 2 o 5 animales por jaula, se han

¹⁰La homología genética describe el fenómeno evolutivo que resulta en la similitud genética entre diferentes organismos descendientes de ancestros comunes, manteniéndose la similitud por medio de mecanismos genéticos que retrasaran, canalizan y dirigen la diversificación evolutiva [84].

¹¹Las enfermedades genéticas hacen referencia a patologías cuyos factores de riesgo están contenidos en el genoma mitocondrial, el genoma nuclear y el metagenoma microbiano [85].

¹²Las enfermedades fenotípicas hacen referencia a patologías con características clínicas observables relacionadas a genotipos subyacentes [86].

observado efectos negativos significativos sobre el estrés y los parámetros inmunitarios, así como afectaciones hormonales [87]. Los factores ambientales, conductuales, metabólicos, fisiológicos y hormonales deben ser considerados para cada estudio, teniendo en cuenta que estos parámetros pueden afectar los resultados durante la experimentación.

2.3.2. Anatomía del miembro posterior y arquitectura muscular

Las estructuras anatómicas del sistema musculoesquelético de los ratones de laboratorio son comparables con las estructuras del sistema musculoesquelético de los humanos. Esta comparación se justifica en el hecho de que los músculos esqueléticos, los tendones, las fascias y los ligamentos de los ratones de laboratorio son histológicamente similares a las estructuras correspondientes en los humanos [92]. Además, al igual que en los humanos, los músculos esqueléticos de los ratones presentan una organización jerárquica que contienen los mismos componentes anatómicos y funcionales descritos en las secciones anteriores. Sin embargo, existen diferencias entre los ratones y los humanos en cuanto a la proporción relativa de los distintos tipos de fibras de los músculos y en la biomecánica de los sistemas musculoesqueléticos durante la locomoción [93, 94]. A pesar de estas diferencias, las estructuras musculares del ser humano pueden ser estudiadas a partir de las estructuras equivalentes en el ratón, y su análisis puede ser en todos los niveles, desde el nivel celular hasta el estudio de toda la estructura completa. En este caso, con base a los propósitos de esta investigación, únicamente se detallará la anatomía del miembro posterior del ratón, haciendo énfasis en los músculos *rectus femoris* y *soleus* (Figura 2.9).

La arquitectura muscular, por otra parte, hace referencia a la disposición de las fibras dentro del músculo esquelético en relación con su eje generador de fuerza. La disposición de fibras tiene impacto en las propiedades generadoras de fuerza y, por extensión, en la función del músculo esquelético. Las variables más importantes de la arquitectura muscular incluyen la longitud de la fibra (L_f), el ángulo de penación (θ) y el área de sección transversal (CSA, por sus siglas en inglés)[95]. La longitud de la fibra es el resultado de la suma de los sarcómeros en serie dentro las miofibrillas musculares y está relacionada directamente con la distancia de acortamiento de la fibra y la velocidad de contracción. El ángulo de penación se define como el ángulo entre la dirección de las fibras musculares y la línea de acción de la fuerza muscular en la porción externa del tendón o en el tendón interno [42]. Por último, el CSA corresponde al área transversal que atraviesa todas las

fibras musculares y está relacionado con los diámetros de las fibras individuales, cuyas implicaciones en la fisiología muscular ya fueron discutidas en las secciones anteriores.

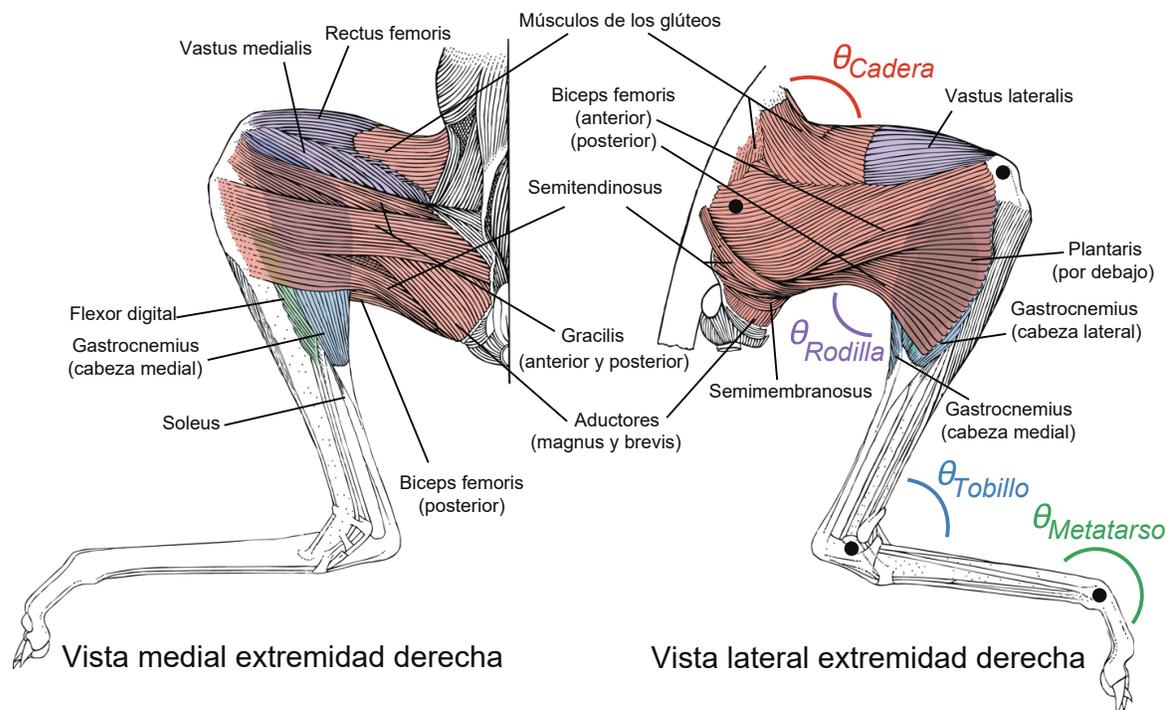


Figura 2.9: Vista medial y lateral de la anatomía muscular del miembro posterior derecho del ratón. Figura tomada de [96].

2.3.2.1. Músculo *rectus femoris*

El *rectus femoris* (RF) es un músculo fusiforme compuesto por fibras superficiales bipeniformes y fibras profundas rectas que se extienden hasta la aponeurosis profunda. Uno de los extremos de este músculo surge de dos tendones que salen de la espina ilíaca anteroinferior y la cresta acetabular, mientras que el otro extremo corresponde a un solo tendón que se inserta en la base de la rótula, formando el tendón rotuliano con el resto de los músculos del *quadriceps* (QA). La función del *rectus femoris* es flexionar la cadera, junto con los músculos sartorio e iliopsoas, y extender la parte inferior de la pierna a la altura de la rodilla, trabajando en conjunto con los otros tres músculos del *quadriceps*. El músculo RF antagoniza a los músculos isquiotibiales de la rodilla y la cadera. Con la rodilla completamente extendida, el *rectus femoris* es relativamente corto, por lo que la flexión de la cadera es limitada, lo que se denomina insuficiencia activa [97]. Por el contrario, cuando

la rodilla está completamente flexionada, el músculo RF está en su longitud máxima y, en consecuencia, se limita la extensión de la cadera, lo que se denomina insuficiencia pasiva [97]. Por último, el *rectus femoris* puede ser categorizado como un músculo glucolítico rápido, ya que está compuesto mayoritariamente por fibras tipo II, en una proporción aproximada de 70 % de fibras tipo II y 30 % de fibras tipo I [98].

2.3.2.2. Músculo *soleus*

La pantorrilla es una zona ubicada de la parte inferior y posterior de la extremidad inferior y está constituida por dos músculos grandes: el *gastrocnemius* (GAST) y el *soleus* (SOL). El *soleus* es un músculo monoarticular multipenado que tiene un origen fibroso en la cabeza y la cara posterior del peroné y se encuentra cubierto por los gemelos del músculo *gastrocnemius* [99]. Después del origen, el SOL forma un vientre muscular que continúa hacia una aponeurosis dirigida longitudinalmente hacia abajo. A nivel del tercio inferior de la pierna, el SOL se une a la fascia profunda de la aponeurosis del músculo *gastrocnemius*, constituyendo el ligamento calcáneo; este último llega al pie y se inserta en la tuberosidad del talón [100]. Los músculos GAST y SOL determinan la flexión plantar y la supinación del pie, además de apoyar la flexión de la rodilla [99]. En cuanto al contenido de fibras musculares, se ha encontrado que el músculo *soleus* presenta un alto contenido de fibras oxidativas lentas; el porcentaje de fibras tipo I en este músculo abarca un amplio rango, que va desde el 60 % al 90 %, dependiendo de la edad del murino, la cepa y la especie [101–103].

2.4. Técnicas para el estudio de músculo esquelético

2.4.1. Registros mecánicos del músculo esquelético

En las secciones anteriores se mencionó que las fibras motoras no suelen contraerse de manera individual, sino colectivamente como miembros de una misma unidad motora; por lo tanto, los registros mecánicos realizados a un músculo esquelético miden la suma de todas las fuerzas de contracción a nivel de unidad motora o superior. En un músculo sano, todas las fibras musculares de una misma unidad motora se activarán en respuesta a estímulos y, dependiendo de la intensidad y frecuencia de los estímulos, se activarán más de una unidad motora a la vez. En consecuencia, no sólo se sumará la fuerza producida

por todas las fibras musculares en una unidad motora individual, sino también la fuerza producida por todas las unidades motoras activas [34]. No obstante, no es usual que en una contracción se activen todas las unidades motoras; más bien funcionan en forma de relevos o mediante reclutamiento siguiendo el *principio del tamaño*.

Las características de la contracción muscular pueden estudiarse provocando estímulos en los músculos esqueléticos. Esto se puede lograr mediante la excitación eléctrica del nervio del músculo, o pasando un breve estímulo eléctrico a través del propio músculo, dando lugar a una única contracción repentina que dura una fracción de segundo [47]. Las contracciones musculares generalmente se clasifican en contracciones isométricas o isotónicas (Figura 2.10 A y B), dependiendo de si el músculo cambia su longitud o no durante la estimulación[34].

2.4.1.1. Contracciones isotónicas vs contracciones isométricas

Las contracciones isotónicas son un tipo de contracción muscular que permite cambios en la longitud del músculo esquelético (Figura 2.10 A), pero con la tensión del músculo constante durante toda la estimulación [47]. Cuando el músculo se acorta la contracción es de tipo concéntrico, mientras que las contracciones de tipo excéntrico implican el alargamiento del músculo [34]. Las contracciones concéntricas involucran el estímulo del sistema nervioso, generando un potencial de acción que contrae a los músculos. Las medidas experimentales de las contracciones concéntricas se realizan atando un extremo del músculo a un sistema de palanca que permite unir pesas, el movimiento de la palanca se registra cuando se estimula el músculo para levantar la carga [47]. A partir de esto, se puede obtener una relación entre la carga sobre el músculo y su correspondiente acortamiento. Las características de la contracción isotónica dependen de la carga contra la que se contrae el músculo, así como de la inercia de la carga [47].

Por otro lado, las contracciones musculares isométricas hacen referencia a un tipo específico de contracción en la que los músculos esqueléticos no experimentan un acortamiento significativo durante la estimulación (Figura 2.10 B). Para medir experimentalmente las características de tensión isométrica de un músculo se debe fijar ambos extremos del músculo de tal manera que se minimice los posibles movimientos, con uno de los extremos conectado a un transductor de fuerza [34]. En el sistema isométrico el músculo se contrae contra el transductor de fuerza sin disminuir la longitud del músculo. El sistema isométrico registra

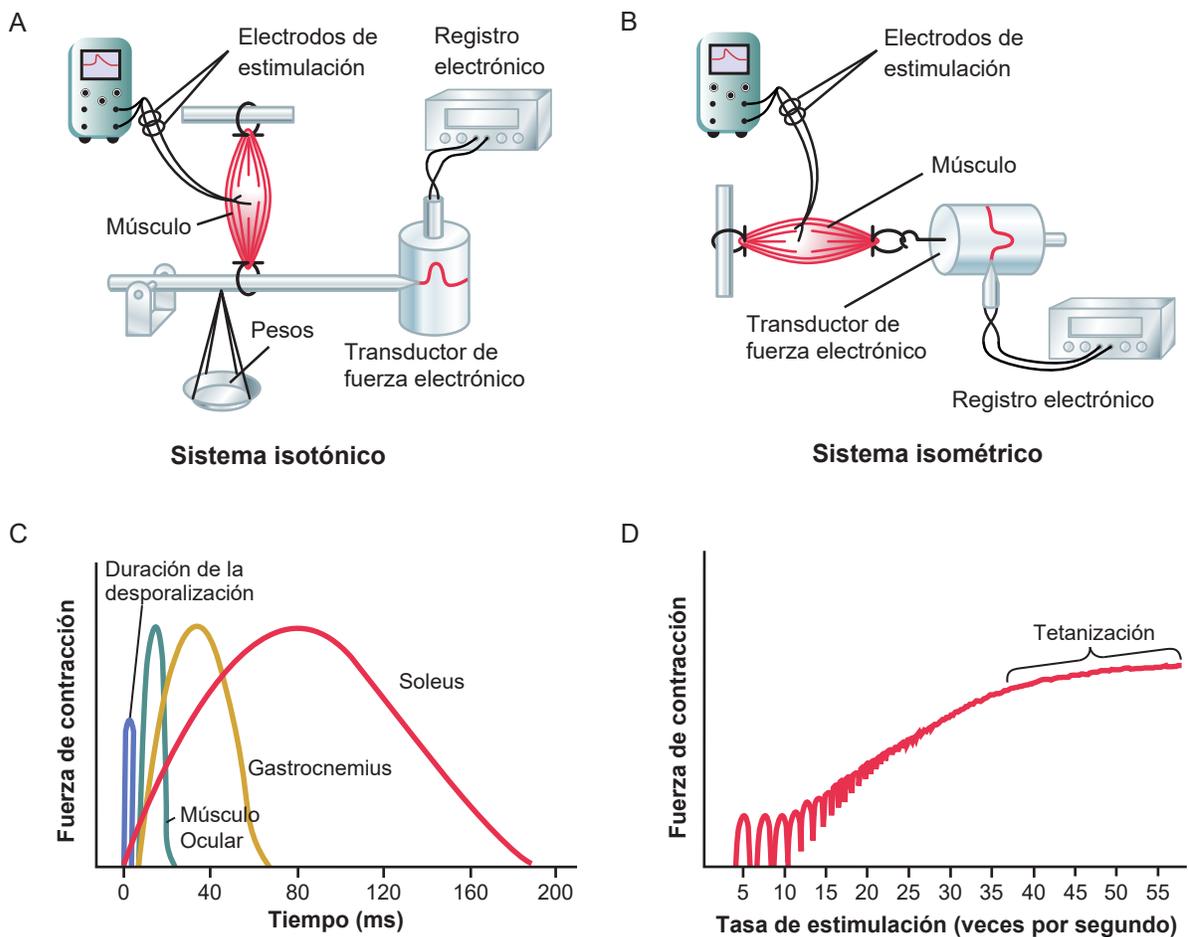


Figura 2.10: Sistemas de registro mio-mecánico para las contracciones de los músculos esqueléticos: sistema isotónico (A) y sistema isométrico (B). La figura muestra la duración de las contracciones isométricas para diferentes tipos de músculos esqueléticos de mamíferos (C) y los fenómenos de sumación y tetanización a frecuencias altas (D). Figura adaptada de [47].

estrictamente los cambios en la fuerza de la contracción muscular. Por lo tanto, el sistema isométrico se usa con mayor frecuencia cuando se comparan las características funcionales de diferentes tipos de músculos [47].

Es importante mencionar que la energía de la contracción muscular varía considerablemente de un músculo a otro, así como las características mecánicas de la contracción muscular (Figura 2.10 C). Existen muchos tamaños de músculos esqueléticos y un amplio rango de diámetros para las fibras musculares que los constituyen; por lo tanto, no es de extrañar que las características de la contracción muscular difieran entre distintos músculos. No obstante, en las investigaciones que analizan las características de la contracción

muscular es usual normalizar los valores de la fuerza desarrollada respecto al CSA del músculo bajo estudio, con el fin de evitar que el tamaño, o el peso, del músculo interfiera con los resultados obtenidos.

2.4.1.2. Sumación, tetanización y fatiga muscular en los registros mecánicos

El fenómeno de sumación se presenta durante las estimulaciones mecánicas de dos maneras: aumentando el número de unidades motoras que se contraen simultáneamente, lo que se denomina sumación de múltiples fibras, o aumentando la frecuencia de contracción, lo que se denomina sumación de frecuencia [47]. La sumación de múltiples fibras ocurre cuando se envía señales que activan varias unidades motoras siguiendo el *principio del tamaño* [42]; mientras que la sumación de frecuencia se produce cuando la frecuencia alcanza un nivel crítico y las contracciones sucesivas eventualmente se vuelven tan rápidas que se fusionan adquiriendo una apariencia suave y continua (Figura 2.10 D) [47]. Al proceso de fusión de las contracciones repetidas se los conoce como tetanización y la fuerza máxima ejercida por el músculo corresponde a la fuerza tetánica. Como se explicó en la Sección 2.1.4.2, una vez alcanzada la fuerza tetánica los aumentos en la frecuencia no tendrán más efecto en el aumento de la fuerza contráctil y con la contracción prolongada se producirá la fatiga muscular.

2.4.2. Tinciones histológicas e histoquímicas del músculo esquelético

Las tinciones histológicas e histoquímicas son fundamentales para el estudio de las propiedades morfológicas y fisiológicas de los tejidos musculares. El proceso de tinción consiste en la aplicación de diferentes compuestos o soluciones colorantes sobre cortes histológicos. Si un componente del tejido tiene una alta afinidad por un colorante determinado, bajo condiciones que favorezcan la reacción, entonces dicho componente se teñirá intensamente. Al usar estas técnicas, se puede demostrar la naturaleza no uniforme del tejido muscular, revelando los elementos constituyentes de las células musculares, así como las diferentes propiedades bioquímicas de distintos componentes y su participación selectiva en ciertos procesos patológicos [17]. Además, las tinciones permiten determinar la ausencia, o el exceso, de enzimas o sustratos específicos, lo cual posibilita la caracterización de alteraciones o anomalías en el tejido muscular después de un experimento.

2.4.2.1. Hematoxilina y eosina

La tinción más utilizada de forma rutinaria es la hematoxilina y eosina (H&E). Su popularidad se basa en su relativa simplicidad y capacidad para mostrar claramente la estructura general del tejido en relación con las fibras, los núcleos, el tejido fibroso y adiposo, la presencia de células inflamatorias y vacuolas, y los componentes vasculares y neurales [17, 104, 105]. El compuesto de hematoxilina tiñe los núcleos celulares de color negro azulado, mientras que la eosina tiñe el citoplasma celular y la mayoría de las fibras del tejido conjuntivo en diferentes tonos e intensidades de rosa. Según la hematoxilina específica utilizada, se puede distinguir unos pequeños puntos en las células que corresponden a la distribución de mitocondrias; las fibras basófilas también pueden reconocerse por su mancha azul. Las áreas eosinófilas, particularmente rojas, pueden ser visibles dentro de las fibras y pueden corresponder a acumulaciones anormales de material miofibrilar o a cuerpos citoplásmicos.

La tinción H&E permite analizar la estructura general del tejido muscular mediante la caracterización del tamaño y los contornos de las fibras; también permite determinar la posición de los núcleos, la cantidad de nervios y vasos sanguíneos, y la existencia de necrosis [18, 106, 107]. La cuantificación del grado de cambio en el tamaño de las fibras musculares se realiza mediante la comparación de los diámetros menores de las fibras, comparando dos situaciones experimentales diferentes o analizando los cambios en las fibras en estudios experimentales realizados sobre un mismo músculo. El diámetro menor es medido para evitar la distorsión que ocurre cuando una fibra muscular se corta oblicuamente, produciendo una apariencia ovalada en la fibra [17]. En la actualidad existe *software* computacional que posibilita realizar la medición del diámetro menor de las fibras, también llamado diámetro de Feret o longitud del calibre. Para un corte histológico completo se calcula el diámetro promedio de las fibras y su desviación estándar, posteriormente se lo compara con valores control.

2.4.2.2. Nicotinamida Adenina Dinucleótido-Tetrazolio Reductasa Reducida

Una de las enzimas oxidativas más útiles para estudios de músculo esquelético es la nicotinamida adenina dinucleótido-tetrazolio reductasa reducida (NADH-TR, por sus siglas en inglés). El principio de la técnica histoquímica NADH-TR es emplear una sal de tetrazolio soluble e incolora como aceptor de electrones; posteriormente esta sal se reduce

a un producto de formazán insoluble de color intenso en los sitio del tejido con actividad enzimática [17]. La sal de tetrazolio utilizada es el nitroazul de tetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés), la cual produce una coloración azulada. La intensidad del producto de reacción de formazán dependerá del número de mitocondrias dentro de una fibra muscular. En consecuencia, este tipo de tinción puede utilizarse para el análisis del metabolismo oxidativo y glucolítico de las fibras musculares [105], y así, diferenciar los tipos de fibras dentro una misma muestra muscular. Las fibras oxidativas tipo I, con un alto contenido mitocondrial, experimentan una mayor coloración con este tipo de tinción; mientras que las fibras glucolíticas tipo II, con poco contenido mitocondrial, adquirirán una coloración menos intensa. Por otra parte, al establecer una correlación entre la reacción NADH-TR con la actividad ATPasa de las fibras musculares, se tiene que en un músculo esquelético las fibras tipo I, de menor actividad ATPasa, reaccionan más intensamente con NADH-TR, las fibras tipo IIb, con la más alta actividad ATPasa, muestran la menor reacción con NADH-TR y las fibras tipo IIa tienen una actividad intermedia [17]. En resumen, la tinción NADH-TR puede distinguir hasta tres tipos de fibras, dependiendo de la concentración del sustrato en el corte histológico. Las fibras tipo I presentarán un color azul más oscuro que las fibras tipo IIb y las fibras tipo IIa mostrarán una intensidad intermedia.

2.4.2.3. Tricromía de Masson

Existen algunas técnicas de tinción disponibles para la diferenciación de los tejidos conectivos en el músculo esquelético, en este grupo de técnicas entran las tinciones tricrómicas. El término tricromía hace referencia al empleo de tres colorantes, uno de los cuales puede ser un colorante nuclear [104]. Los métodos de tricromía se utilizan para diferenciar entre el colágeno y las fibras musculares. El colágeno puede ser diferenciado de forma selectiva mediante soluciones compuestas de colorantes ácidos, como en el caso de la tricromía van Gieson, o mediante combinaciones secuenciales de colorantes ácidos, como es el caso de la tricromía de Masson.

En la técnica de Masson el colágeno se tiñe fuertemente, debido a la afinidad de los grupos catiónicos de las proteínas por los grupos reactivos aniónicos de los colorantes ácidos [104]; como resultado, la tricromía de Masson permite la diferenciación selectiva de las fibras musculares, las fibras de colágeno, la fibrina y los eritrocitos. Este método suele proporcionar más información que la tinción estándar con hematoxilina y eosina, debido a que la tinción tricrómica de Masson no solo mantiene intacta la morfología general

de los tejidos, sino que también tiene la ventaja de utilizar tres tintes que permiten la identificación de múltiples estructuras tisulares [108]. Los tres colorantes que se aplican en esta técnica son: hematoxilina férrica de Weigert, solución escarlata de Biebrich y solución azul de anilina. Al aplicar secuencialmente estos tintes sobre el músculo esquelético se pueden distinguir núcleos, fibras musculares, eritrocitos y fibras de colágeno. Este método es adecuado para la evaluación de la extensión y distribución de la fibrosis de manera cuantificable, y puede aplicarse con éxito para la detección o diagnóstico de enfermedades fibróticas [108]. Con la tinción de Masson, las fibras musculares y la fibrina adquieren una coloración roja o rosa, el colágeno presentará un color azul y el tejido conectivo puede aparecer con una coloración amarillenta o verdosa. Una de las principales aplicaciones de la tricromía de Masson es la determinación de la existencia de cúmulos de tejido conectivo después de realizar un determinado experimento muscular, lo cual es un indicador de fibrosis en los músculos esqueléticos [109]. Además, la presencia de colágeno en las fibras puede interpretarse como un indicador de daño y recuperación muscular, que por lo general acompaña a procesos de formación de fibrosis en los músculos esqueléticos [110].

Capítulo 3

Metodología

3.1. Animales

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Mecanobiología del Músculo de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. El laboratorio cuenta con la aprobación de la Comisión de Ética Académica y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias (CEARC) para desarrollar estudios funcionales y estructurales del complejo costamérico en músculo estriado de murinos en condiciones normales y patológicas, con número de aprobación PI 2019-2-001. En este trabajo se utilizaron 21 ratones hembra de la cepa C57BL/6J, de 10 semanas de edad, con peso corporal de 16.6 ± 0.7 g. Los ratones hembra fueron alojados en un ambiente controlado a temperatura ambiente (19 - 22 °C), con un ciclo de luz y oscuridad de 12:12 horas, y acceso a alimento estándar de laboratorio (Nutricubos, AgribRANDS Purina México S.A. de C.V., México) y agua potable, suministrados de forma *ad libitum* durante todo el tiempo de experimentación. Los especímenes se dividieron aleatoriamente en tres grupos: grupo de control (C; n = 7), grupo de entrenamiento HIIT de resistencia (E, n = 7) y grupo de inmovilización (I, n = 7). El entrenamiento tuvo una duración de cuatro semanas (28 días), mientras que la inmovilización tuvo una duración de tres semanas (21 días). Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con 63 mg/kg de pentobarbital sódico (Pisabental, PISA Agropecuaria, Atitalaquia, Hidalgo, México) o 120 mg/kg de ketamina (Ketamin-Pet, Aranda, Santiago de Querétaro, Querétaro, México), tanto para la realización de los registros mio-mecánicos, como para la extracción de los músculos esqueléticos. Todos los

especímenes fueron sacrificados mediante dislocación cervical inmediatamente después de la terminación de los registros mio-mecánicos.

3.2. Modelos experimentales

Antes de llevar a cabo la experimentación, se realizó un control inicial del peso corporal y la morfometría de los miembros posteriores para los tres grupos de investigación. Los parámetros morfométricos que se midieron fueron los siguientes: diámetro del muslo medial, diámetro mayor de la pantorrilla, perímetro del muslo medial y perímetro mayor de la pantorrilla. Los diámetros del muslo y la pantorrilla fueron medidos en el plano frontal de los ratones hembra. La región más grande de la pantorrilla se encuentra aproximadamente a la mitad de la distancia entre el tobillo y la rodilla, en la zona donde se ubican las partes más anchas de las cabezas musculares del *gastrocnemius*; mientras que la región medial del muslo se encuentra en la mitad de las articulaciones de la rodilla y la cadera.

3.2.1. Entrenamiento HIIT de resistencia

El grupo de experimentación E fue sometido a un protocolo de entrenamiento a intervalos de alta intensidad en una caminadora para roedores de cinta rodante (OA-CaminaRAT-3C-LC, Omniaiva, Ciudad de México, México). La caminadora cuenta con un sistema de angulación que proporciona distintos ángulos de pendiente, un sistema de control de velocidad para la cinta rodante y una rejilla de descarga con amperaje máximo de 3 mA que entrega descargas eléctricas a los ratones para estimular su movimiento. Antes de empezar con el régimen de entrenamiento, los ratones pasaron por un periodo de aclimatación al dispositivo. Este periodo de aclimatación tuvo una duración de seis días y se dividió en dos subperiodos de tres días: el primer subperiodo constituido por rutinas de exploración libre de 10 minutos sin movimiento de la cinta rodante, con ángulo de inclinación de 0° y la rejilla de descarga desactivada, y un segundo subperiodo de caminatas ligeras a velocidad constante de 12 m/min durante 10 minutos, con ángulo de inclinación de 0° y con la rejilla de descarga activada a 1 mA. Una vez terminado el periodo de aclimatación, empezó el régimen de HIIT de resistencia, el cual tuvo una duración total de cuatro semanas (28 días). El protocolo HIIT se realizó con la caminadora inclinada a una angulación de 26° , utilizando un programa modificado del protocolo de entrenamiento de 10 minutos propuesto por Seldeen *et al.* [27]. El entrenamiento comenzó con un periodo de calentamiento

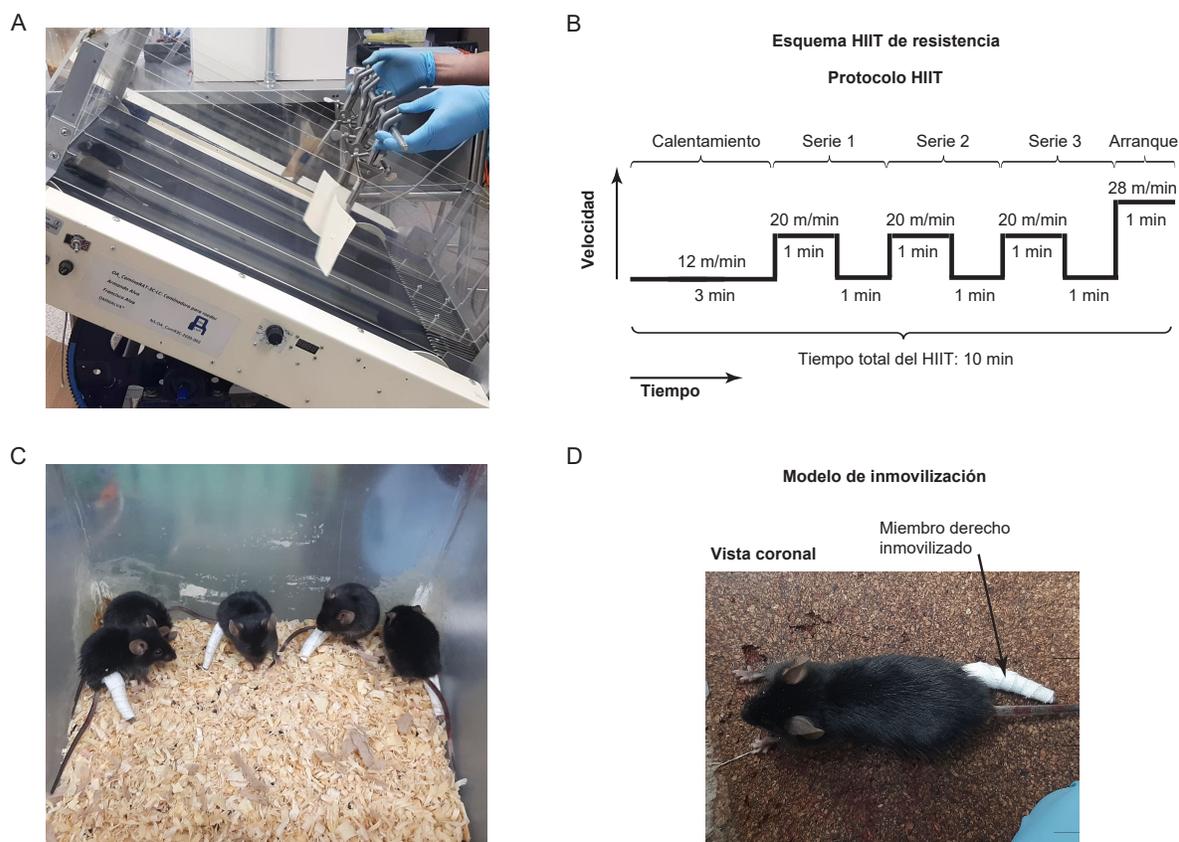


Figura 3.1: Modelos de experimentación para el músculo esquelético del miembro posterior de los ratones hembra C57BL/6J. Se muestra a un grupo de especímenes realizando el entrenamiento en la caminadora (A) y la descripción esquemática del protocolo HIIT de resistencia (B). También se observa a un grupo de animales inmovilizados (C) y la vista coronal de un espécimen inmovilizado, indicando la fijación de la extremidad en posición extendida (D).

de tres minutos a velocidad constante de 12 m/min, seguido de tres series de intervalos de 1 minuto con velocidad aumentada a 20 m/min, intercalados con periodos de 1 minuto de descanso activo a 12 m/min, por último, se aplicó un intervalo de arranque con velocidad máxima constante de 28 m/min durante 1 minuto (Figura 3.1 A y B). Los animales que cesaban de correr fueron motivados a continuar con el entrenamiento empujándolos con arreglo de varillas metálicas cubiertas con papel cartón. Los ratones hembra entrenados fueron alojadas en jaulas con un hacinamiento máximo de seis murinos y libre acceso a la comida estándar de laboratorio y agua potable. Los animales de entrenamiento fueron evaluados todos los días, con la finalidad de detectar posibles lesiones que afecten el experimento; además, se realizaron controles de peso y medidas morfométricas los días 7, 14, 21 y 28 después del inicio del entrenamiento. Adicionalmente, se controló el consumo semanal

de alimento y bebida durante todo el periodo de entrenamiento. Los músculos esqueléticos de los miembros posteriores (*soleus* y *rectus femoris*) se diseccionaron cuidadosamente, registrando su sección transversal máxima, su longitud óptima de máxima contracción y su peso. Al terminar con la realización de los registros mio-mecánicos se sacrificó a los especímenes mediante dislocación cervical.

3.2.2. Inmovilización

Se realizó una inmovilización del miembro posterior derecho para todos los animales del grupo experimental I. La fijación del miembro posterior se llevó a cabo desde la articulación de la cadera hasta la región metatarsiana, en una posición de flexión plantar completa (Figura 3.1 C y D). La inmovilización fue realizada con el miembro posterior completamente extendido, sujetado con cinta atlética de algodón (Cramer, Warrenville, Illinois, USA) pegada al pelaje con *spray* adherente (Cramer, Warrenville, Illinois, USA) y fijado con cinta adhesiva deportiva (Cramer, Warrenville, Illinois, USA), siguiendo los protocolos de inmovilización reportados y validados en la literatura [111–113]. Esta técnica imita las condiciones de inmovilización clínica, minimizando los efectos del desuso muscular y la atrofia en el miembro afectado, ya que los músculos esqueléticos inmovilizados en posiciones alargadas experimentan una menor atrofia que los músculos inmovilizados en posiciones acortadas [75].

Después de la inmovilización, los ratones hembra fueron alojados en jaulas con un hacinamiento máximo de cinco murinos y libre acceso a la comida estándar de laboratorio y agua potable. Al igual que con el grupo de entrenamiento, los animales del grupo de inmovilización fueron evaluados todos los días con la finalidad de detectar posibles alteraciones al experimento, como por ejemplo, daños en el material de fijación, presencia de inflamación en las extremidades y extracción completa del material inmovilizante. La inmovilización tuvo un periodo de duración de 21 días, se realizaron controles de peso en los días 7, 14 y 21 después de la inmovilización y las medidas morfométricas fueron registradas al inicio y al final del experimento. En este caso también se controló el consumo semanal de alimento y bebida durante todo el periodo de experimentación. Los músculos esqueléticos del miembro posterior derecho (*soleus* y *rectus femoris*) se diseccionaron cuidadosamente, registrando su sección transversal máxima, su longitud óptima de máxima contracción y su peso. Al terminar con la realización de los registros mio-mecánicos se sacrificó a los especímenes mediante dislocación cervical.

3.3. Registros mio-mecánicos

Se estudiaron las propiedades mio-mecánicas de dos músculos de la extremidad posterior de los ratones hembra: *rectus femoris* (RF) y *soleus* (SOL). Los músculos se eligieron con base a su composición de fibras musculares, el *rectus femoris* compuesto mayoritariamente de fibras rápidas tipo II [98] y el *soleus* conformado principalmente por fibras lentas tipo I [101, 103]. Los músculos fueron montados en un miógrafo o transductor de resorte de fuerza-desplazamiento (FT03C, Grass, Quincy, Massachusetts, USA) conectado a un amplificador de señal de un solo canal (FE221, Bridge Amp, ADInstruments, Dunedin, Nueva Zelanda), el cual a su vez se conectó a un dispositivo de adquisición de datos y generador de estímulos por diferencia de potencial (ML840, PowerLab 4/20, ADInstruments, Dunedin, Nueva Zelanda). Se conectaron electrodos de platino en el dispositivo PowerLab 4/20 para transmitir los impulsos a los músculos esqueléticos bajo estudio y generar las contracciones. Se realizaron mediciones de la fuerza generada en la longitud óptima de respuesta contráctil de los músculos (l_0), la tensión tetánica y el tiempo de fatiga muscular. La máxima fuerza que pueden generar los músculos se obtiene a l_0 , que es la longitud que tienen los músculos cuando sus tendones se encuentran fijados en las inserciones o puntos de origen anatómicos. Con los registros mio-mecánicos se pudieron determinar las tensiones específicas de contracción a diferentes frecuencias de estimulación normalizando la fuerzas obtenidas para el área de sección transversal de los músculos (CSA, por sus siglas en inglés). También se obtuvieron las curvas de fuerza específica en función de la frecuencia y las curvas de fatiga muscular [114].

3.3.1. Disección de los músculos *rectus femoris* y *soleus* de ratón

Antes de realizar la disección de los músculos esqueléticos, se anestesiaron a los especímenes de los 3 grupos experimentales (grupo C, grupo I y grupo E). La disección se llevó a cabo rápidamente, de tal manera que el montaje en el transductor y el registro de las fuerzas se realizaron dentro de los 20 minutos posteriores a la anestesia [114]. Cada espécimen fue colocado en posición supina para la disección del músculo *rectus femoris* y en posición prono para la disección del músculo *soleus*. La separación de los músculos se realizó en una bandeja de disección, sujetando las extremidades de los animales con alfileres. Se abrió la piel y se expusieron las fascias de los músculos *quadriceps* (QA) y *gastrocnemius* (GAST), también se expuso la inserción del músculo *quadriceps* en la rodilla

y la inserción del músculo *gastrocnemius* en el tobillo. La extracción del músculo *rectus femoris* se realizó con una pinza, separando la fascia que une este músculo con las otras tres cabezas del músculo *quadriceps*. Posteriormente, la inserción del músculo RF en la rodilla fue cortada y, manteniendo su tendón sujeto a una pinza, se separó el músculo completo del resto de la musculatura desde la rodilla hacia la cadera, procurando mantener la inserción de la cadera intacta. Por otro lado, para la extracción del músculo *soleus*, se cortó directamente el grupo de tendones de la inserción del músculo *gastrocnemius* en el tobillo, luego se usaron estos tendones para separar el músculo *gastrocnemius* hasta exponer el tendón del músculo SOL. Por lo general, la extracción del músculo *gastrocnemius* también incluye la extracción del músculo *soleus*; por este motivo, se identificó y aisló el tendón del músculo SOL dentro del grupo de los tendones del músculo GAST y se separó el músculo *soleus* manteniendo su inserción a nivel de la cabeza del peroné intacta. Para el caso de los ratones hembra del grupo I la disección de los músculos esqueléticos fue realizada únicamente en la extremidad inmovilizada. Durante todo el proceso de disección, los músculos se mantuvieron hidratados usando gotas de solución Krebs, de tal forma que sus características fisiológicas no se vieron afectadas. Finalmente, los tendones libres de los músculos RF y SOL fueron atados a un hilo.

3.3.2. Montaje del *rectus femoris* y *soleus* de ratón en el miógrafo

Después de aislar los músculos esqueléticos de interés, cada ratón fue colocado en la bandeja del dispositivo de registros mio-mecánicos. De manera similar al proceso de disección, el montaje del músculo *rectus femoris* en el miógrafo fue realizado con los animales colocados en posición supina (Figura 3.2 A y B); mientras que el montaje del músculo *soleus* fue realizado con los ratones en posición prono (Figura 3.2 C y D). Para evitar un registro incorrecto de fuerza se sujetaron las extremidades de los ratones hembra con alfileres sobre una bandeja colocada junto al miógrafo. Los tendones libres de los músculos RF y SOL fueron fijados directamente en el sensor del miógrafo (previamente calibrado). El montaje de los músculos RF y SOL fue de tal forma que quedaron completamente suspendidos en el aire, sujetos de forma horizontal únicamente por sus tendones, uno de ellos fijado en el sensor del miógrafo y el otro en su lugar anatómico de inserción (Figura 3.2). El transductor del dispositivo se encuentra acoplado a un sistema de micromanipulación (32181, PRIOR, England) que permite realizar desplazamientos precisos en los 3 ejes de

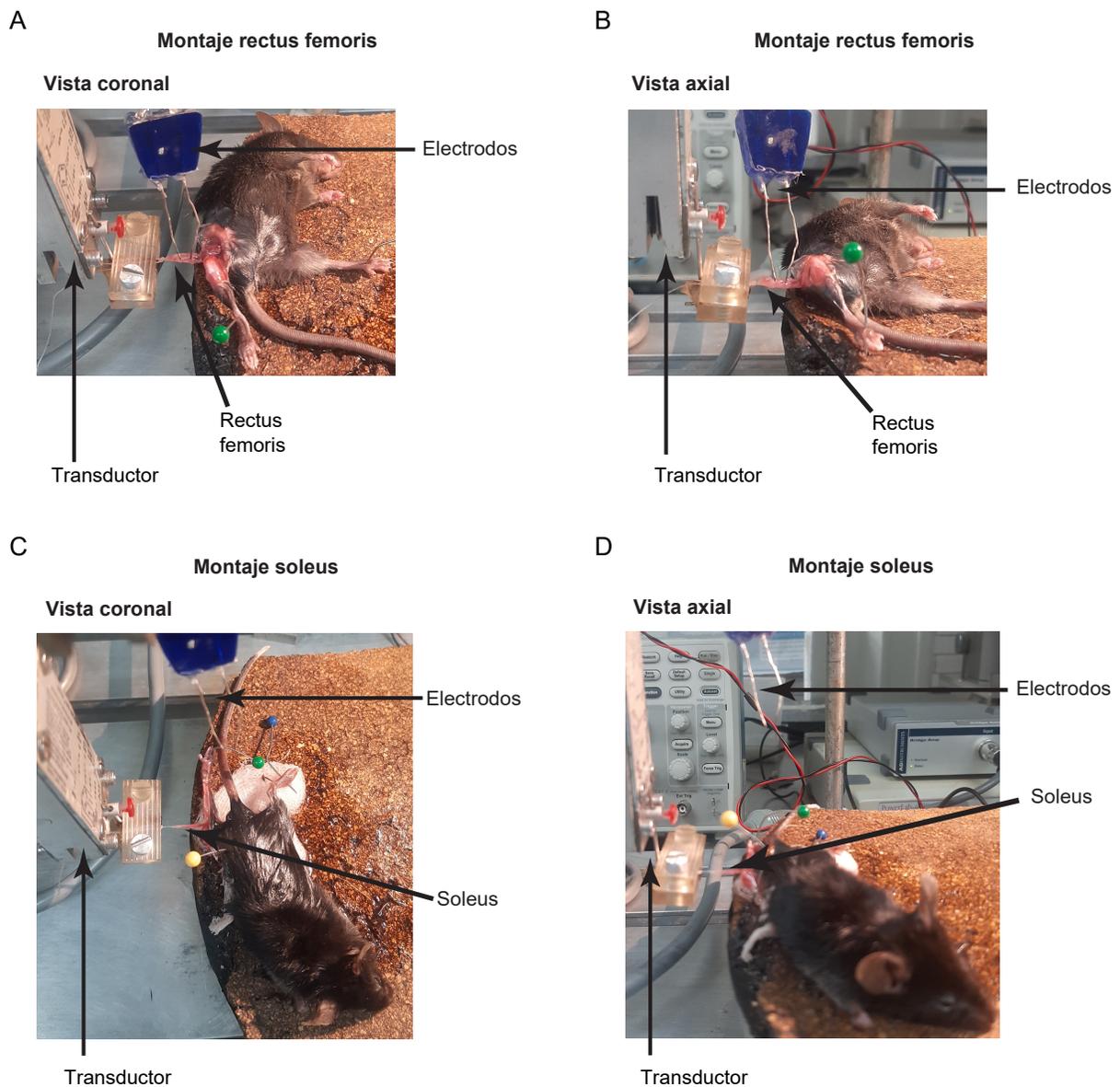


Figura 3.2: Montaje de los músculos esqueléticos en el miógrafo para los registros mio-mecánicos. Se muestran las vistas coronal y axial de los montajes del *rectus femoris* (A y B) y del *soleus* (C y D). En el caso del *rectus femoris* se indica la posición de los electrodos sobre el músculo para la realización del protocolo de estimulación. A pesar de que en el *soleus* no se muestra el posicionamiento de los electrodos, la configuración es similar que en el caso del *rectus femoris*.

movimiento. Con la ayuda de este sistema se posicionaron a los músculos con su eje longitudinal paralelo a la base, alineando los extremos de los tendones con el eje longitudinal. El dispositivo transductor tiene un resorte que detecta las contracciones experimentadas por el músculo al estimularse, lo cual implica que las contracciones vencen el potencial elástico del resorte. Los estímulos fueron realizados aplicando pulsos eléctricos sobre los

músculos, transmitidos por electrodos de platino colocados en la parte media de las muestras musculares. Para este tipo de estudios, también fue necesario mantener los músculos hidratados con solución Krebs, de forma que se conservaron las características fisiológicas de los músculos durante la estimulación. Los registros de las respuestas mio-mecánicas se realizaron con el sistema de adquisición de datos y generador de estímulos (ML840, PowerLab 4/20, ADInstruments, Dunedin, Nueva Zelanda) y posteriormente fueron almacenados en una computadora portátil (ASUS, ASUSTeK Computer Inc, Taipei, Taiwán). La visualización y el análisis de los registros se llevó a cabo en el *software* LabChart V8.1.12 (ADInstruments, Dunedin, Nueva Zelanda).

3.3.3. Protocolo de estimulación para registros mio-mecánicos

3.3.3.1. Estímulo de contracción

Los músculos fueron montados en el miógrafo de manera que no haya laxitud en las fibras musculares. Es importante mencionar que la fuerza activa máxima para un músculo solo puede alcanzarse dentro de un rango de longitud muscular óptimo; por lo tanto, a longitudes musculares más cortas, o largas, la fuerza que el músculo puede producir será menor a la máxima. El pulso eléctrico para las estimulaciones fue configurado con un voltaje de 5.0 V y una duración de 5.0 μ s, esta configuración forma parte del protocolo de estimulación mio-mecánica para murinos establecido en el Laboratorio de Mecanobiología y está basado en los parámetros utilizados en otras investigaciones [114, 115]. Posteriormente, se determinó la longitud óptima de máxima respuesta contráctil del músculo, l_0 , estirando gradualmente cada músculo hasta encontrar la máxima tensión de contracción durante una sacudida o estímulo a 0.5 Hz, para esto se empleó el *software* LabChart V8.1.12 para la visualización de las fuerzas desarrolladas por los músculos durante la estimulación inicial. Se permitió que el músculo permanezca en reposo durante 1 min antes de empezar con el protocolo de estimulación.

3.3.3.2. Frecuencias del protocolo de estimulación

Los estímulos fueron realizados aplicando el pulso eléctrico definido anteriormente. Se aplicó un conjunto de estímulos en longitud muscular óptima, con frecuencias de 0.5, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 Hz, permitiendo que los estímulos tengan una duración aproximada de

2 segundos para cada frecuencia, excepto para la frecuencia de 80 Hz cuya duración se extiende hasta que los músculos estimulados alcancen la fatiga. El tiempo de duración de los estímulos y las frecuencias empleadas también forman parte del protocolo de estimulación mio-mecánica para murinos del Laboratorio de Mecanobiología y está basado en protocolos reportados en otras investigaciones [114, 115]. Para cada frecuencia de estimulación se registró el máximo de tensión de contracción, P_t (mN), incluyendo las estimulaciones a frecuencias más altas, donde se observó el fenómeno de sumación. La fatiga muscular fue analizada en la frecuencia de estimulación de 80 Hz, aunque la fuerza tetánica, P_o (mN), se alcanzó entre los 40 y 80 Hz. En el análisis de la fatiga se midió el tiempo que tardaron los músculos esqueléticos en disminuir la fuerza tetánica máxima hasta un 20 % de su valor inicial. Finalmente, se volvió a aplicar estímulos a una frecuencia de 40 Hz, esperando alcanzar el mismo valor de tensión que en la primera estimulación a la misma frecuencia, lo cual comprueba que las propiedades mecánicas de los músculos no experimentaron alteraciones.

3.3.3.3. Recopilación de datos al final del protocolo de estimulación

Al finalizar el protocolo de estimulación, y con los músculos montados en el miógrafo, se midieron el diámetro de la sección transversal (cm) y la longitud óptima de los músculos, l_0 (cm). Para tener medidas precisas de estas magnitudes se empleó un calibrador Vernier (531-129, Mitutoyo, Japón), con precisión de 0.05 mm, y los valores obtenidos fueron transformados a centímetros. También se midió el peso (mg) de los músculos RF y SOL, quitando los hilos en los tendones, extrayendo completamente los músculos y pesándolos en una balanza digital de alta precisión (TS4KS Precision Standard, OHAUS, USA). Con estos datos se calculó el área de sección transversal (CSA) de los músculos *rectus femoris* y *soleus* empleando la siguiente ecuación [42, 48, 96]:

$$CSA = \frac{M}{\rho \cdot l_f} \quad (3.1)$$

donde M es peso muscular (mg), $\rho = 1.056 \text{ g/cm}^3$ es la densidad del músculo [48] y l_f (cm) es la longitud de fibra. No obstante, determinar la sección transversal de un músculo no siempre es una operación sencilla. Es simple para músculos con fibras paralelas, pero para músculos que presentan ángulos de penación el cálculo del CSA no es tan directo. Para tales músculos la única sección transversal válida es la de todas las fibras musculares. Esta

sección transversal, ortogonal a la dirección longitudinal de todas las fibras del músculo, se denomina sección transversal fisiológica y el área correspondiente se conoce como área de sección transversal fisiológica (PCSA, por sus siglas en inglés) [42]:

$$PCSA = \frac{M \cdot \cos \theta}{\rho \cdot l_f} \quad (3.2)$$

donde el término θ representa el ángulo de penación de las fibras musculares. En este estudio no se midieron experimentalmente los ángulos de penación de las fibras de los músculos *rectus femoris* y *soleus*, ni tampoco se midieron sus longitudes de sarcómero; por lo tanto, se consideró pertinente estimar el PCSA de los músculos esqueléticos mediante la Ecuación 3.1 del CSA, considerando la longitud de fibra igual a la longitud óptima de los músculos ($l_f = l_0$). Esta estimación es adecuada para los músculos RF y SOL porque investigaciones previas han reportado que los ángulos de penación de estos músculos son relativamente pequeños, lo que implica que el $\cos \theta$ es cercano a 1 [42].

Por otra parte, con los pesos musculares y corporales se calculó la razón de masas músculo:cuerpo [114]:

$$\text{Razón músculo : cuerpo} = \frac{\text{masa muscular}}{\text{masa corporal}} \quad (3.3)$$

esta razón es un buen indicador para el análisis de los cambios de la masa de los músculos esqueléticos en relación a los cambios en el peso de los especímenes.

Como se mencionó anteriormente, con los registros mio-mecánicos se obtuvo la tensión generada durante las estimulaciones a distintas frecuencias, P_t (mN), la tensión máxima generada durante el tétanos, P_o (mN), y el tiempo de fatiga a 80 Hz. El cálculo de las fuerzas específicas en cada frecuencia se realizó dividiendo los valores de P_t entre el CSA de cada músculo [114]:

$$\text{Tensión de contracción específica} = \frac{P_t}{CSA} \left(\frac{N}{cm^2} \right) \quad (3.4)$$

donde el factor CSA se empleó como un estimador del PCSA. Se construyeron algunas gráficas para el análisis de las propiedades mio-mecánicas de los músculos: curva de fuerza específica vs frecuencia (fuerzas específicas máximas frente a frecuencia de estimulación) y la curva de fatiga a 80 Hz (fuerza de contracción frente al tiempo) [114]. Es importante mencionar que, para evitar que el tamaño de los músculos interfiera con los resultados

obtenidos, también se decidió normalizar los valores de las tensiones tetánicas, P_o , respecto al CSA de los músculos bajo estudio.

3.4. Tinciones histológicas e histoquímicas

Los análisis histológicos e histoquímicos se realizaron en los mismos músculos que fueron seleccionados para los registros mio-mecánicos, es decir, el músculo *rectus femoris* compuesto mayoritariamente de fibras rápidas tipo II y el músculo *soleus* conformado principalmente por fibras lentas tipo I.

3.4.1. Disección y preparación de las muestras musculares

El proceso de disección completa de los músculos RF y SOL fue idéntico al procedimiento descrito en la Sección 3.3 y se realizó al finalizar los registros mio-mecánicos. La mayoría de los animales permanecieron bajo los efectos de la anestesia durante la extracción de los músculos; sin embargo, en algunos casos fue necesario aplicar nuevamente la anestesia en las concentraciones especificadas anteriormente. Durante el proceso de extracción de los músculos esqueléticos también se mantuvo la hidratación con solución Krebs, de esta manera que se garantizó la conservación de las propiedades fisiológicas musculares. En el caso de los ratones hembra del grupo I, la extracción de los músculos esqueléticos también fue realizada únicamente en la extremidad inmovilizada.

Después de la disección, los músculos esqueléticos RF y SOL fueron sumergidos durante de 20 segundos en aceite para bebé (MENNEN, Colgate-Palmolive, Nueva York, USA) contenido dentro de una caja Petri de 100×15 (PYREX, Ciudad de México, México). Al mismo tiempo, se colocaron varios criotubos de 1.8 ml (CRM Globe, Tlacoquemécatl, Mexico) en nitrógeno líquido (-196 °C) durante un tiempo aproximado de 30 segundos. Posteriormente, se retiraron los criotubos del nitrógeno líquido y se colocaron los músculos esqueléticos de manera individual en el interior de cada criotubo, procurando extraer el exceso de aceite en cada músculo. Una vez que los músculos se encontraron en el interior de los criotubos, estos se cerraron y se les colocó nuevamente en nitrógeno líquido durante 5 minutos aproximadamente [116]. El nitrógeno líquido tiene la capacidad de reducir rápidamente la temperatura de cualquier muestra, lo cual en principio evitaría la generación de daños en la estructura tisular de los músculos; no obstante, se consideró necesario aplicar

aceite en los músculos para prevenir posibles daños por el rápido cambio de temperatura y proteger el interior de la muestra muscular. Finalmente, todos los músculos esqueléticos extraídos, y contenidos en sus correspondientes criotubos, fueron etiquetados y almacenados en un congelador biomédico (MDF-U334, Panasonic, Kadoma, Osaka, Japón) a -30°C .

3.4.2. Cortes histológicos

Los cortes histológicos se realizaron en un crióstato de corte micrométrico (MEV, SLEE Medical, Nieder-Olm, Alemania). Antes de realizar la criosección el crióstato fue preenfriado a $-22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Después de esto, las muestras musculares fueron colocadas en el interior del crióstato durante al menos 20 minutos para alcanzar el equilibrio térmico [116]. Una vez alcanzado el equilibrio, se cortó con una cuchilla una rodaja transversal de la región de mayor diámetro de los músculos esqueléticos y se colocó en los soportes metálicos redondos del crióstato usando gel congelante (CRYO GLUE, SLEE Medical, Nieder-Olm, Alemania). La fijación de las rodajas transversales fue realizada de tal forma que sus secciones transversales quedaron paralelas a la superficie de los soportes metálicos. Al momento de realizar los cortes, la temperatura del crióstato se mantuvo en $-22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y el espesor de corte fue fijado en $10\ \mu\text{m}$. Una vez obtenido el corte histológico, se recogió el tejido muscular en un portaobjetos de microscopio (VELAB, Velab México, Ciudad de México, México) de 0.8 - 1.1 mm de espesor, tamaño de $26 \times 76\ \text{mm}$ y cargados positivamente a temperatura ambiente. Todos los cortes histológicos obtenidos fueron fijados con alcohol etílico absoluto al 100 % (W4177, Wöhler de México, México) antes de procesarlos en las tinciones histológicas e histoquímicas.

3.4.3. Protocolos de tinción

3.4.3.1. Tinción H&E

Se utilizó un protocolo de tinción H&E modificado a partir de los protocolos reportados en la literatura [17, 116]:

1. La fijación de los cortes histológicos, colocados en los portaobjetos, fue realizada con alcohol etílico absoluto al 100 %. Los cortes histológicos se mantuvieron en el contenedor por un tiempo aproximado de 20 segundos.

2. Se transfirieron sucesivamente los portaobjetos con los cortes fijados en contenedores con alcohol etílico absoluto a diferentes concentraciones: 100 %, 95 % y 80 %. Los cortes histológicos se colocaron en cada contenedor por un tiempo aproximado de 20 segundos.
3. Se transfirieron los portaobjetos a un frasco de tinción con agua corriente y se mantuvo la llave de agua abierta para que los portaobjetos fuesen lavados durante 1 minuto.
4. Se colocaron los portaobjetos en un frasco de tinción con hematoxilina de Harris (Hycel, Hycel de México, Zapopan, México) previamente filtrada durante un tiempo aproximado de 6 minutos con el objetivo de teñir los núcleos.
5. Se transfirieron los portaobjetos a un frasco de tinción con agua corriente y se mantuvo la llave de agua abierta para que los portaobjetos sean lavados durante 10 minutos.
6. Los portaobjetos fueron colocados en un contenedor con alcohol al 95 % durante 20 segundos.
7. Se colocaron los portaobjetos en un frasco de tinción con solución de eosina (Hycel, Hycel de México, Zapopan, México) durante 3 minutos, con el propósito de teñir el citoplasma celular y los tejidos conectivos.
8. Los portaobjetos fueron colocados en un contenedor con alcohol al 95 % durante 20 segundos.
9. Se transfirieron sucesivamente los portaobjetos a dos frascos de tinción con alcohol al 100 % por un tiempo de 20 segundos en cada frasco.
10. Se sacaron los portaobjetos del último frasco con alcohol y se esperó hasta que quedaran secos.
11. Se montaron los portaobjetos con bálsamo Canada en Xilol (Hycel, Hycel de México, Zapopan, México) y se les cubrió con cubreobjetos (LAUKA, Ciudad de México, México) de 0.13 - 0.17 mm de espesor y tamaño de 24×50 mm.
12. Se guardaron los portaobjetos a temperatura ambiente.

3.4.3.2. Tinción NADH-TR

Para realizar la tinción NADH-TR se prepararon las siguientes soluciones: TRIS Buffer, solución NADH, solución NBT y soluciones de acetona a diferentes concentraciones. Las preparaciones de las soluciones se realizaron siguiendo las instrucciones reportadas en la literatura [17]. La solución TRIS Buffer se preparó mezclando 1.43 g de TRIS HCl (ChemCruz, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), 0.42 g de TRIS base (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA) y 250 ml de agua desionizada. Se verificó que la mezcla tuviese un pH de 7.6 a 0.05 M en condiciones de temperatura ambiente y se conservó refrigerada a 4 °C. Para la solución NADH se mezcló 80 mg de sal disódica β -Nicotinamida adenina dinucleótido reducida (ChemCruz, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) en 50 ml de solución TRIS Buffer y se conservó en refrigeración a -20 °C. La solución NBT se preparó disolviendo 200 mg de Cloruro de tetrazolio p-nitroazul (ChemCruz, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) en 100 ml de solución TRIS Buffer, la mezcla fue conservada en una botella de vidrio y en refrigeración a 4 °C. Las soluciones de acetona (Meyer, Química Suastes, Ciudad de México, México) se elaboraron a concentraciones de 30 %, 60 % y 90 %. Posteriormente, se utilizaron las soluciones de acetona de distintas concentraciones para preparar 30 ml de nuevas soluciones, mezclando las soluciones de acetona con agua desionizada: 10 ml de acetona al 30 % + 20 ml de agua desionizada, 20 ml de acetona al 60 % + 10 ml de agua desionizada y 30 ml de acetona al 90 % pura. En este caso, se decidió no realizar la preparación del medio de montaje acuoso, en lugar de eso, se utilizó bálsamo Canada en Xilol para el montaje de los cortes histológicos.

Se utilizó un protocolo de tinción NADH-TR modificado a partir de los protocolos reportados en la literatura [17, 117]:

1. Se extrajo la solución NADH del congelador y se esperó hasta que se descongelara a temperatura ambiente.
2. La fijación de los cortes histológicos, colocados en los portaobjetos, fue realizada con alcohol etílico absoluto al 100 %. Para esto se utilizó un frasco con alcohol al 100 % por un tiempo aproximado de 20 segundos.
3. Se transfirieron sucesivamente los portaobjetos con los cortes fijados en contenedores con alcohol etílico absoluto a diferentes concentraciones: 100 %, 95 % y 80 %, por un tiempo aproximado de 20 segundos cada uno.

4. Se transfirieron los portaobjetos a un frasco de tinción con agua corriente y se mantuvo la llave de agua abierta para que los portaobjetos se enjuagaran durante 1 minuto.
5. Se colocaron los portaobjetos en cestas de soporte para tinciones a temperatura ambiente, con el fin de escurrir el exceso de agua.
6. Se mezclaron partes iguales de solución NADH y solución NBT, 4 ml cada una, en un tubo de cultivo sin labio (PIREX, Corning Incorporated, Nueva York, USA) de 10 ml. La mezcla NADH + NBT es fotosensible, por lo que se cubrió completamente el tubo con papel aluminio (Sterling Wrap).
7. Con una micropipeta de laboratorio (Ecospet, Industrias Bioselec SA CV, Ciudad de México, México), se colocaron 100 μ l de la solución NADH + NBT sobre cada corte histológico de los portaobjetos, asegurándose de que quedaran completamente cubiertos.
8. Los portaobjetos con los cortes histológicos cubiertos de NADH + NBT fueron incubados durante 40 minutos a 37°C empleando un tanque de agua para baño María.
9. Se transfirieron sucesivamente los portaobjetos en contenedores con las soluciones de acetona de 30 %, 60 % y 90 % dejando los portaobjetos en cada contenedor por un tiempo aproximado de 6 segundos. Para el caso del contenedor con acetona al 90 %, el tiempo de inmersión de los portaobjetos se extiende un poco, hasta que se observe una nube violácea tenue sobresaliendo de los cortes (aproximadamente 10 segundos).
10. Se transfirieron sucesivamente los portaobjetos a dos frascos de tinción con alcohol al 100 % por un tiempo de 20 segundos en cada frasco.
11. Se sacaron los portaobjetos del último frasco con alcohol y se esperó hasta que quedaran secos.
12. Se montaron los portaobjetos con bálsamo Canada en Xilol y se cubrió con cubreobjetos de 0.13 - 0.17 mm de espesor y tamaño de 24×50 mm.
13. Se guardaron los portaobjetos a temperatura ambiente.

3.4.3.3. Tinción Tricromía de Masson

Para realizar la tinción tricrómica de Masson se prepararon las siguientes soluciones: hematoxilina férrica de Weigert, ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico, azul de anilina y ácido acético al 1%. Las preparaciones de las soluciones también se realizaron siguiendo las instrucciones reportadas en la bibliografía [108]:

1. Hematoxilina férrica de Weigert

a) Solución A:

- Hematoxilina (Hycel, Hycel de México, Zapopan, México) 100 ml.

b) Solución B:

- Cloruro férrico (Materiales y Abastos Especializados, Ciudad de México, México) al 29% en agua desionizada 4 ml.
- Agua desionizada 95 ml.
- Ácido clorhídrico concentrado (Hycel, Hycel de México, Zapopan, México) 1 ml.

Se mezcló partes iguales de la solución A y B. Esta solución de trabajo es estable durante 3 meses.

2. Ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico

- Ácido fosfomolibdico (Meyer, Química Suastes, Ciudad de México, México) al 5% 25 ml.
- Ácido fosfotúngstico (Meyer, Química Suastes, Ciudad de México, México) al 5% 25 ml.

3. Azul de anilina

- Azul de anilina (Meyer, Química Suastes, Ciudad de México, México) 2.5 g.
- Ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA) 2 ml.
- Agua desionizada 100 ml.

4. Ácido acético al 1%

- Ácido acético glacial 1 ml.

- Agua desionizada 99 ml.

Se utilizó un protocolo de tinción de Masson modificado a partir de los protocolos reportados en la literatura [108, 109]:

1. La fijación de los cortes histológicos, colocados en los portaobjetos, fue realizada con alcohol etílico absoluto al 100 %. Los cortes histológicos se mantuvieron en el contenedor por un tiempo aproximado de 20 segundos.
2. Se transfirieron sucesivamente los portaobjetos con los cortes fijados en contenedores con alcohol etílico absoluto a diferentes concentraciones: 100 %, 95 % y 80 %, por un tiempo aproximado de 20 segundos cada uno.
3. Se transfirieron los portaobjetos a un frasco de tinción con agua corriente y se mantuvo la llave de agua abierta para que los portaobjetos fuesen enguajados durante 1 minuto.
4. Se sumergieron los portaobjetos en solución de Bouin (Hycel, Hycel de México, Zapopan, México) durante 60 minutos a 60 °C.
5. Se transfirieron los portaobjetos a un frasco de tinción con agua corriente hasta que el exceso de la solución Bouin fuese retirado (aproximadamente 1 minuto).
6. Se colocaron los portaobjetos en un frasco de tinción con hematoxilina férrica de Weigert durante 20 minutos.
7. Se transfirieron los portaobjetos a un frasco de tinción con agua corriente durante 10 minutos.
8. Se colocaron los portaobjetos en un frasco de tinción con Fucsina escarlata-ácida de Biebrich (Hycel, Hycel de México, Zapopan, México) durante 15 minutos.
9. Se transfirieron los portaobjetos a un frasco de tinción con agua corriente hasta que el exceso de la solución Biebrich fuese retirado (aproximadamente 1 minuto).
10. Se sumergieron los portaobjetos en un frasco de tinción con ácido fosfotúngstico/-fosfomolíbico durante 2 minutos para los cortes de los músculos grandes (*rectus femoris*) y 50 segundos para los cortes de los músculos pequeños (*soleus*).

11. Inmediatamente se transfirieron los portaobjetos a un frasco de tinción con azul de anilina (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA) durante 10 minutos.
12. Se realizaron inmersiones rápidas con los portaobjetos en ácido acético al 1 % hasta remover el exceso de azul de anilina (3 a 4 inmersiones).
13. Se realizaron 2 inmersiones rápidas con los portaobjetos en alcohol al 95 % para remover los residuos de azul de anilina.
14. Se transfirieron sucesivamente los portaobjetos a dos frascos de tinción con alcohol al 100 %, realizando una solo inmersión en cada frasco.
15. Se montaron los portaobjetos con bálsamo Canada en Xilol y se cubrió con cubreobjetos de 0.13 - 0.17 mm de espesor y tamaño de 24×50 mm.
16. Se guardaron los portaobjetos a temperatura ambiente.

3.4.4. Recolección de datos a partir de los cortes histológicos

Una vez realizadas las diferentes tinciones, los cortes histológicos fueron visualizados en un microscopio invertido de campo claro de luz transmitida y contraste de interferencia diferencial (Axio Observer 5, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemania) con una configuración de aumento de 20× objetivo y 10× ocular. Las imágenes de los distintos cortes se capturaron con la cámara digital de alta resolución integrada al microscopio (AxioCam 208 color, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemania) y fueron procesadas inicialmente con el *software* ZEN 3.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemania). Para los cortes del músculo *rectus femoris* se tomaron 8 campos microscópicos de 1920×1080 píxeles, mientras que para los cortes del músculo *soleus* únicamente se tomaron 4 campos microscópicos del mismo tamaño de píxeles. El número de campos microscópicos se determinó de tal forma que las imágenes adquiridas abarquen todo el corte histológico de cada músculo sin superposición de estructuras. El análisis de las imágenes histológicas se realizó en el *software* ImageJ [118]. En este programa se observó la estructura general de los tejidos musculares, la composición de fibras y la presencia de distintas estructuras morfológicas, comparando los parámetros observados entre los diferentes grupos de experimentación (grupo C, grupo E y grupo I).

Con las imágenes de la tinción H&E se determinaron los diámetros promedio de las fibras musculares y los porcentajes de núcleos concéntricos. El diámetro promedio de las fibras para cada corte histológico fue obtenido promediando los diámetros mínimos de Feret de cada fibra muscular. Adicionalmente al diámetro de las fibras, también se calculó el coeficiente de variabilidad, que se define de la siguiente manera [17]:

$$\text{Variabilidad} = 1000 \times \frac{\sigma_{diam}}{D_{prom}} \quad (3.5)$$

donde D_{prom} y σ_{diam} corresponden al promedio y la desviación estándar del diámetro de las fibras, respectivamente. En un músculo normal, el coeficiente de variabilidad es inferior a 250, cualquier muestra con un coeficiente de variabilidad superior a 250 se considerará como anormal [17], presentando heterogeneidades localizadas en los diámetros de las fibras. Todos estos parámetros fueron medidos en cada uno de los grupos experimentales, de esta forma se pudo determinar la existencia de cambios en las propiedades morfológicas de los músculos en los grupos de entrenamiento e inmovilización, en comparación con el grupo control.

Para el caso de las imágenes de la tinción NADH-TR, se identificaron los distintos tipos de fibras presentes en los cortes histológicos y se calculó los porcentajes de cada tipo de fibra muscular. La tinción NADH-TR permite identificar a las fibras de acuerdo a su metabolismo oxidativo y contenido mitocondrial [105], diferenciando hasta tres tipos de fibras musculares en diferentes tonalidades de azul. Sin embargo, en este estudio solo se identificaron dos tipos de fibras: las fibras lentas tipo I, teñidas en un tono azul intenso oscuro, y las fibras rápidas tipo II, que presentaron una coloración azul menos intensa. Al cuantificar los porcentajes de cada tipo de fibra y comparar entre los distintos grupos se pudo determinar si los modelos experimentales de inmovilización y entrenamiento causaron algún tipo de conversión entre las fibras musculares de los músculos *rectus femoris* y *soleus*.

Por último, con la tricromía de Masson se evaluó la existencia de colágeno y tejido conectivo dentro de las fibras musculares. La presencia de estas estructuras en los cortes histológicos se determinó identificando las zonas teñidas en azul (colágeno) y en amarillo o verde (fibrosis). Como se mencionó anteriormente, la presencia de colágeno en exceso es un indicador de daño y recuperación muscular que suele acompañar a procesos de formación de tejido conectivo en los músculos esqueléticos [110]. En este caso, tanto la presencia de colágeno, como de tejido conectivo, fueron analizadas de manera cualitativa, identificando

los cortes histológicos que mostraron más zonas teñidas y comparando entre los distintos grupos de experimentación y control. Esta tinción complementó los hallazgos encontrados con las técnicas H&E y NADH-TR, brindando mayor información de los cambios en las propiedades morfológicas de los músculos esqueléticos de los grupos de entrenamiento e inmovilización.

3.5. Análisis estadístico

Se utilizó el *software* Microsoft Excel V 2302 (Microsoft Corporation, Albuquerque, Nuevo México, USA) para los análisis estadísticos. Todos los valores fueron reportados como promedio \pm desviación estándar (SD). Para los casos en que los parámetros medidos individuales presentaron su propia SD se calculó el promedio y la desviación estándar ponderada [119]. Para todos los parámetros medidos, la significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía con análisis *post-hoc* de Bonferroni, con pruebas t pareadas cuando las comparaciones entre los promedios de los parámetros se realizaron dentro de un mismo grupo y pruebas t no pareadas cuando las comparaciones se realizaron entre distintos grupos [120]. Los valores obtenidos con $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos con el ANOVA de una vía, pero al realizar el análisis *post-hoc* los valores de significancia se redujeron dependiendo del número de comparaciones realizadas, ya que el método de Bonferroni es muy conservador y el α ajustado a menudo se reduce conforme aumenta el número de pruebas [120]. Para las comparaciones realizadas entre los grupos C, E e I el valor de significancia se fijó en $p < 0.016$. En el caso de las ingestas de alimentos y agua, dentro de un mismo grupo, el nivel de significancia fue fijado en $p < 0.008$. Para los pesos corporales y los parámetros morfométricos, dentro de un mismo grupo, los valores de significancia se fijaron de la siguiente manera: $p < 0.005$ en grupos C y E, $p < 0.05$ para los parámetros morfométricos del grupo I y $p < 0.008$ para los pesos corporales del grupo I.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Animales

4.1.1. Ingesta de alimentos y líquidos

Las ingestas semanales de alimentos y líquidos fueron registradas tanto para los animales de los grupos de experimentación (grupo E y grupo I) como para los animales del grupo control (grupo C). Para el grupo E se registraron las ingestas de 4 semanas, correspondientes al tiempo de duración del entrenamiento HIIT; mientras que para el grupo I se registraron las ingestas de 3 semanas, las cuales corresponden a las semanas de inmovilización (Tabla 4.1). En el caso del grupo C, se decidió llevar el registro del consumo de alimentos y líquidos durante 4 semanas.

Las ingestas semanales por ratón fueron calculadas midiendo la cantidad semanal de alimento y líquido consumida en cada jaula de crianza y dividiéndola para el número de ratones hembra contenidos en cada jaula. En los grupos C y E se registraron aumentos, no mayores al 10.0 %, en los consumos de alimentos durante la segunda semana de observación, seguido de disminuciones en el consumo para el resto de semanas. La mayor disminución en la ingesta de alimentos se presentó en el grupo C, alrededor de un 15.0 % entre la tercera y cuarta semana; mientras que para el grupo E, la mayor disminución se presentó entre la segunda y tercera semana, registrándose una reducción en el consumo del 9.0 %. En el caso del grupo I, la ingesta de alimentos mostró un comportamiento creciente, evidenciándose aumentos del 7.2 % y 3.6 % para la segunda y tercera semana, respectivamente. Por otro

Tabla 4.1: Ingestas semanales por ratón: consumos de alimento y agua para los grupos control (C), entrenamiento (E) e inmovilización (I), durante el tiempo de experimentación.

	Consumo de alimento (g)			Consumo de agua (ml)		
	Grupo C	Grupo E	Grupo I	Grupo C	Grupo E	Grupo I
1 ^{ra} semana	21.8 ± 0.8	19.3 ± 2.6	18.1 ± 2.5	26.0 ± 6.5	44.9 ± 14.7	33.0 ± 3.2
2 ^{da} semana	23.2 ± 0.9	21.2 ± 3.4	19.4 ± 2.6	26.0 ± 10.0	42.8 ± 10.3	35.6 ± 3.5
3 ^{ra} semana	20.7 ± 4.9	19.3 ± 1.9	20.1 ± 3.5	31.0 ± 11.0	31.5 ± 2.8	34.2 ± 4.0
4 ^{ta} semana	17.6 ± 1.5	17.7 ± 1.7	—	27.1 ± 5.1	30.3 ± 3.1	—
Promedio total	20.8 ± 1.2	19.4 ± 1.1	19.2 ± 1.5	27.5 ± 3.3	37.4 ± 4.4	34.3 ± 1.9

Se realizaron pruebas ANOVA con *post hoc* de Bonferroni. Se buscaron diferencias significativas dentro de cada grupo ($p = 0.008$) y entre grupos diferentes ($p = 0.016$).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo, ni entre grupos diferentes.

El promedio total se calculó considerando todos los consumos registrados durante los periodos de monitorización.

lado, los consumos de líquidos en los tres grupos de estudio mostraron comportamientos diferentes. En el grupo C, el mayor consumo de líquidos se presentó en la tercera semana, alcanzando un valor promedio de 31.0 ± 11.0 ml, un 19.2% superior a los consumos de las dos primeras semanas y un 14.4% mayor al consumo de la cuarta semana. En el grupo I se observó un comportamiento similar, en la primera semana se promedió un consumo de 33.0 ± 3.2 ml, seguido de un aumento del 7.9% en la segunda semana y una disminución del 3.9%, respecto a la semana anterior, para la tercera semana. En el grupo E se observó un decremento de la ingesta de líquidos en todas las semanas, al final de la primera semana se registró un promedio de 44.9 ± 14.7 ml, continuando con disminuciones semanales del 4.7%, 26.4% y 3.8% para segunda, tercera y cuarta semana, respectivamente. Si bien, dentro del grupo E, se obtuvo una disminución considerable entre los consumos de líquidos de la segunda y tercera semana, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa; es más, no se encontraron diferencias significativas entre los consumos semanales de todos los grupos de estudio.

Adicionalmente, se compararon los promedios totales de las ingestas de alimentos y líquidos entre los tres grupos. El consumo de alimentos fue mayor en el grupo control, un 7.2% mayor al consumo del grupo de entrenamiento HIIT y un 8.3% mayor al grupo de inmovilización. El consumo de líquidos, por otra parte, fue mayor en el grupo de entrenamiento, con un promedio total de 37.4 ± 4.4 ml, lo que representa una diferencia del 36.0% con el consumo del grupo control y del 9.0% con el consumo obtenido para el grupo de inmovilización. En ambos casos, las diferencias encontradas entre los consumos de los 3 grupos no fueron estadísticamente significativas.

4.1.2. Peso corporal y parámetros morfométricos

Para los grupos C y E se registraron los cambios corporales semanales durante 4 semanas, mientras que para el grupo I, los registros semanales se realizaron durante 3 semanas (Tabla 4.2). A diferencia de los controles de ingesta, los registros de los cambios corporales incluyen medidas iniciales, tomadas antes de empezar con las semanas de monitorización y los modelos experimentales de entrenamiento e inmovilización. Para el caso del grupo I las medidas de los parámetros morfométricos se realizaron antes de iniciar con la inmovilización e inmediatamente después de terminar con la tercera semana de inmovilización. Los parámetros morfométricos que se tomaron en consideración ya fueron descritos en el Capítulo 3.

Las diferencias experimentadas en los pesos corporales y los parámetros morfométricos fueron analizadas en todos los grupos. Las evoluciones temporales en los parámetros medidos para cada uno de los ratones hembra pertenecientes a los distintos grupos se muestran en las gráficas del Anexo A. Se compararon las variaciones en los promedios de los parámetros entre cada semana de monitorización, la mayoría de los promedios obtenidos presentaron comportamientos y evoluciones consistentes con lo que se esperaría encontrar en las situaciones experimentales y en la condición control.

En el grupo C, los ratones hembra mostraron incrementos y disminuciones tanto en los diámetros, como en los perímetros, del muslo y la pantorrilla (Tabla 4.2); sin embargo, no se observó una tendencia sostenida en estas variaciones, ni tampoco se encontraron diferencias comparativas significativas en la mayoría de ellas, a excepción del diámetro de pantorrilla, que mostró una diferencia estadísticamente significativa entre la cuarta y la primera semana de monitorización ($p = 0.004$). En comparación con los promedios iniciales, el diámetro y el perímetro del muslo incrementaron en un 3.1 % y 2.2 %, respectivamente; mientras que el diámetro y el perímetro de la pantorrilla disminuyeron en un 3.2 % y un 0.4 %, también respectivamente.

En el grupo E, los valores promedio de los diámetros y los perímetros mostraron un comportamiento decreciente a lo largo de las semanas (Tabla 4.2). Respecto a los promedios iniciales, las reducciones porcentuales para el diámetro de muslo, diámetro de pantorrilla, perímetro de muslo y perímetro de pantorrilla fueron del 8.1 %, 19.8 %, 4.8 % y 4.7 %, respectivamente. Los ANOVA realizados en este grupo indicaron la existencia de diferencias significativas para el diámetro de pantorrilla y los perímetros de muslo y

Tabla 4.2: Peso corporal y parámetros morfométricos de los animales de los grupos control (C), entrenamiento (E) e inmovilización (I).

	Grupo C	Grupo E	Grupo I
Iniciales:			
Diámetro muslo (mm)	3.21 ± 0.05	3.60 ± 0.07*	3.04 ± 0.17 [†]
Diámetro pantorrilla (mm)	1.87 ± 0.03	2.07 ± 0.05*	1.77 ± 0.12
Perímetro muslo (mm)	16.01 ± 0.22	17.44 ± 0.09*	16.03 ± 0.38 [†]
Perímetro pantorrilla (mm)	10.80 ± 0.05	10.99 ± 0.03	10.86 ± 0.16
Peso corporal (g)	16.1 ± 0.5	18.6 ± 1.3	15.3 ± 1.4
1 ^{ra} semana:			
Diámetro muslo (mm)	3.29 ± 0.07	3.53 ± 0.08*	—
Diámetro pantorrilla (mm)	1.97 ± 0.04	2.01 ± 0.07	—
Perímetro muslo (mm)	16.63 ± 0.16	17.11 ± 0.14*	—
Perímetro pantorrilla (mm)	10.93 ± 0.05	10.86 ± 0.06	—
Peso corporal (g)	15.6 ± 0.5	18.6 ± 1.3	15.2 ± 1.8
2 ^{da} semana:			
Diámetro muslo (mm)	3.33 ± 0.08	3.41 ± 0.07	—
Diámetro pantorrilla (mm)	1.86 ± 0.02	1.81 ± 0.06	—
Perímetro muslo (mm)	16.40 ± 0.17	16.89 ± 0.11 ^{i,*}	—
Perímetro pantorrilla (mm)	10.80 ± 0.05	10.69 ± 0.10	—
Peso corporal (g)	16.2 ± 0.4	18.6 ± 1.3	16.6 ± 1.6
3 ^{ra} semana:			
Diámetro muslo (mm)	3.37 ± 0.07	3.43 ± 0.10	2.97 ± 0.15
Diámetro pantorrilla (mm)	1.89 ± 0.05	1.71 ± 0.06 ⁱ	1.76 ± 0.13
Perímetro muslo (mm)	16.46 ± 0.17	16.73 ± 0.09 ⁱ	15.51 ± 0.24 ^{*†}
Perímetro pantorrilla (mm)	10.86 ± 0.02	10.64 ± 0.08 ⁱ	10.34 ± 0.14 ^{i,*}
Peso corporal (g)	16.9 ± 0.6	18.8 ± 1.3	16.7 ± 1.5
4 ^{ta} semana:			
Diámetro muslo (mm)	3.31 ± 0.07	3.31 ± 0.14	—
Diámetro pantorrilla (mm)	1.81 ± 0.03 ¹	1.66 ± 0.05 ^{i,1,*}	—
Perímetro muslo (mm)	16.37 ± 0.16	16.61 ± 0.06 ⁱ	—
Perímetro pantorrilla (mm)	10.76 ± 0.02	10.47 ± 0.06 ^{i,1,*}	—
Peso corporal (g)	17.2 ± 0.4	18.7 ± 1.4	—
Promedio total:			
Peso corporal (g)	16.4 ± 0.2	18.6 ± 0.6*	15.9 ± 0.8 [†]

Los superíndices i, 1, 2 y 3 indican diferencias estadísticamente significativas entre el valor medido y el correspondiente valor inicial, de la 1ra, 2da y 3ra semana, respectivamente ($p < 0.005$ en grupos C y E o $p < 0.05$ en el grupo I).

Los símbolos *, * y [†] indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.016$) entre los grupos C y E, grupos C e I y grupos E e I, respectivamente.

Los pesos corporales reportados en el grupo I fueron calculados restando el peso de la cinta de inmovilización (0.04 g).

El promedio total de los pesos se calculó considerando todos los pesos corporales registrados en cada grupo.

pantorrilla. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el diámetro de pantorrilla inicial y el diámetro obtenido en la tercera ($p = 5.2 \times 10^{-4}$) y la cuarta

semana ($p = 8.0 \times 10^{-5}$) de entrenamiento, también se encontraron diferencias significativas entre los promedios de la primera y la cuarta semana ($p = 0.002$). Para el perímetro del muslo se encontraron diferencias significativas entre el valor inicial y los promedios de la segunda ($p = 0.002$), la tercera ($p = 1.4 \times 10^{-4}$) y la cuarta semana ($p = 6.8 \times 10^{-6}$). En lo que respecta al perímetro de pantorrilla, se encontraron diferencias significativas entre el promedio inicial y los valores de la tercera ($p = 0.003$) y la cuarta ($p = 8.3 \times 10^{-6}$) semana, así como entre los promedios de la primera y la cuarta semana de entrenamiento ($p = 5.8 \times 10^{-4}$).

Para el grupo I, se registraron los pesos corporales al inicio de la inmovilización y durante las tres semanas de duración del experimento; los promedios de los parámetros morfométricos, por el contrario, solo fueron registrados al inicio de la inmovilización y al final de la tercera semana de experimentación, debido a que el vendaje realizado en la extremidad inmovilizada no permitió realizar la toma de medidas morfométricas (Tabla 4.2). Todos los parámetros morfométricos del grupo I disminuyeron al completar el periodo de inmovilización. El diámetro de muslo se redujo en un 2.3 %, el diámetro de pantorrilla en un 0.6 % y el perímetro de muslo en un 3.2 %. En este caso, se encontraron diferencias estadísticamente significativas únicamente en el perímetro de pantorrilla ($p = 0.03$), con una disminución respecto al valor inicial del 4.8 %.

En cuanto al peso corporal, no se hallaron diferencias significativas entre semanas dentro de cada grupo. Los pesos corporales de los especímenes del grupo C experimentaron incrementos y decrementos a lo largo de las semanas, aunque el mayor peso corporal promedio se alcanzó en la última semana de control, siendo un 6.8 % mayor que el peso promediado en el inicio de la monitorización. En el grupo E los promedios del peso corporal no se vieron alterados hasta terminar la segunda semana de entrenamiento, a partir de la tercera semana los promedios aumentaron ligeramente, hasta alcanzar un valor de 18.7 ± 1.4 g en la cuarta semana, apenas un 0.5 % mayor que el peso corporal promedio inicial. Para el grupo I se obtuvo un comportamiento similar, no se observaron cambios notables en la primera semana, pero al finalizar la inmovilización se registró un peso corporal promedio 9.2 % mayor al peso inicial. En todos los grupos, los pesos corporales de los animales bajo estudio sufrieron cambios en las diferentes semanas, aumentando o disminuyendo el promedio semanal; sin embargo, al finalizar la monitorización todos los grupos presentaron un aumento en el promedio del peso corporal respecto a su valor inicial. Al comparar los pesos promedios totales entre los grupos, se obtuvieron diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos C y E ($p = 4.4 \times 10^{-4}$) y los grupos E e I ($p = 0.005$).

Adicionalmente, se compararon los pesos corporales y los parámetros morfométricos semanales entre los distintos grupos, aunque para algunos parámetros de la primera, segunda y cuarta semana solo se pudo comparar entre los grupos C y E. El mayor promedio para el peso corporal inicial se obtuvo en el grupo E, un 15.5% mayor al promedio del grupo C y un 21.6% mayor al promedio del grupo I. El peso corporal promedio de los especímenes siempre fue mayor en el grupo E para el resto de las semanas. Las diferencias porcentuales entre los pesos corporales de los grupos E y C y los grupos E e I fueron respectivamente las siguientes: 19.2% y 22.4% al finalizar la primera semana, 14.8% y 12.0% al final de la segunda semana y 11.2% y 12.6% al terminar la tercera semana. Al culminarse la cuarta semana el promedio del peso corporal del grupo E fue un 8.7% mayor a la media obtenida en el grupo C. No se encontraron diferencias significativas en los pesos corporales iniciales ni en los pesos registrados en el resto de semanas. Los promedios de los parámetros morfométricos iniciales también fueron mayores en el grupo E, se encontraron diferencias significativas entre los grupos E y C en el diámetro del muslo con un 12.1% ($p = 7.3 \times 10^{-4}$), el diámetro de la pantorrilla con un 10.7% ($p = 0.004$) y el perímetro del muslo con un 8.9% ($p = 5.8 \times 10^{-5}$); también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos E e I en el diámetro del muslo con un 18.4% ($p = 0.01$) y el perímetro del muslo con un 8.8% ($p = 0.004$). Al finalizar la primera semana, los especímenes del grupo E mostraron mayores promedios respecto al control en el diámetro de muslo con una diferencia del 7.3%, el diámetro de pantorrilla con un 2.0% y el perímetro de muslo con un 2.9%, solo en el perímetro de pantorrilla el grupo control presentó un mayor promedio con una diferencia del 0.6%. Las diferencias significativas para la primera semana se presentaron en el diámetro y el perímetro del muslo, con un valor de significancia $p = 0.04$ en ambos casos. Al terminar la segunda semana, los animales del grupo E mostraron mayores promedios en el diámetro y el perímetro del muslo, con diferencias porcentuales respecto al control del 2.4% y 3.0%, respectivamente; por el contrario, los promedios del diámetro y el perímetro de la pantorrilla fueron mayores en el grupo C y sus diferencias porcentuales respecto al grupo E fueron del 2.8% y el 1.0%, también respectivamente. Para la segunda semana solo se encontró una diferencia significativa en el perímetro del muslo, con el mismo valor de significancia que los obtenidos para los parámetros de la

primera semana ($p = 0.04$). En la tercera semana los ratones hembra del grupo I terminaron su periodo de inmovilización, los promedios de los parámetros morfométricos de este grupo fueron menores que los obtenidos en los grupos C y E. Al comparar con el control, las diferencias porcentuales observadas en el grupo I fueron las siguientes: 13.5 % para el diámetro de muslo, 7.4 % para el diámetro de pantorrilla, 6.1 % para el perímetro de muslo y 5.0 % para el perímetro de pantorrilla. En el caso del grupo E, los promedios del diámetro y el perímetro del muslo fueron mayores que los obtenidos en el grupo control, con sus respectivas diferencias porcentuales del 1.8 % y 1.6 %; por otra parte, en el grupo C los promedios del diámetro y el perímetro de la pantorrilla fueron mayores que los promedios del grupo E con diferencias del 10.5 % y el 2.1 %, respectivamente. Las diferencias significativas en la tercera semana se encontraron en el perímetro del muslo para los grupos C e I ($p = 0.007$) y los grupos E e I ($p = 4.6 \times 10^{-4}$), y en el perímetro de la pantorrilla para los grupos control e inmovilización ($p = 0.003$). Al terminar la cuarta semana los especímenes del grupo E finalizaron su entrenamiento, en esta semana los promedios del diámetro y el perímetro de la pantorrilla del grupo E fueron menores que los promedios del control, con sus respectivas diferencias del 9.0 % y el 2.8 %; por otro lado, el promedio del perímetro del muslo fue mayor en el grupo E, con una diferencia respecto al control del 1.5 %, mientras que en el caso del diámetro del muslo no se encontraron diferencias porcentuales. Para la cuarta semana las diferencias significativas se presentaron en el diámetro y en el perímetro de la pantorrilla, con valores de significancia de 0.02 y 7.6×10^{-4} , respectivamente.

Es importante mencionar que las variaciones obtenidas en los promedios de los pesos corporales y los parámetros morfométricos de los distintos grupos no necesariamente reflejan los cambios experimentados por cada uno de los especímenes. Algunos animales de los grupos experimentales mostraron variaciones en los parámetros morfométricos y los pesos corporales distintas a las descritas por los promedios de cada grupo, es decir, las evoluciones temporales individuales de algunos de los parámetros medidos en los especímenes no necesariamente coinciden con las evoluciones temporales de los promedios registrados dentro de su respectivo grupo, especialmente en las semanas intermedias de cada experimento (Anexo A). Por ejemplo, de manera general se observaron decrementos en los promedios semanales de los parámetros morfométricos de los animales entrenados e inmovilizados, sin embargo, existen especímenes que experimentaron aumentos en algunos parámetros, aunque estas variaciones no alteraron las tendencias observadas en el resto de los especímenes y en los promedios obtenidos dentro de cada grupo de experimentación,

por lo que se considera que estas variaciones son propias de una población de organismos vivos.

4.2. Registros mio-mecánicos

Las propiedades mio-mecánicas de los músculos *rectus femoris* (RF) y *soleus* (SOL), para cada grupo de estudio, se determinaron midiendo la tensión máxima de contracción generada por los músculos a distintas frecuencias de estimulación (Tabla 4.3). Antes de iniciar con el protocolo de estimulación se registró el peso corporal de cada animal y, para cada músculo bajo estudio, se midió la longitud óptima del músculo a la cual se obtuvo la máxima respuesta contráctil, l_0 , el diámetro de sección transversal y el peso.

Tabla 4.3: Parámetros registrados durante la realización de los registros mio-mecánicos de los músculos *rectus femoris* y *soleus*.

	Grupo C	Grupo E	Grupo I
Peso corporal (g)	17.2 ± 0.4	18.7 ± 1.4	16.7 ± 1.5
<i>Rectus femoris:</i>			
Peso (mg)	74.9 ± 5.9	59.0 ± 4.5	55.4 ± 6.8
Longitud óptima l_0 (mm)	11.0 ± 0.3	11.1 ± 0.2	11.1 ± 0.4
Diámetro de sección transversal (mm)	4.0 ± 0.4	3.9 ± 0.2	3.3 ± 0.2
Razón músculo:cuerpo ($\times 10^{-3}$)	4.7 ± 0.6	3.8 ± 0.2	3.4 ± 0.1
Fuerza tetánica P_0/CSA (N/cm ²)	2.9 ± 0.3	2.6 ± 0.2	2.5 ± 0.1
Tiempo de fatiga (s)	11.2 ± 1.1	14.3 ± 1.1	11.1 ± 1.0
<i>Soleus:</i>			
Peso (mg)	4.7 ± 0.5	6.7 ± 0.7	4.4 ± 0.6
Longitud óptima l_0 (mm)	9.5 ± 0.2	9.6 ± 0.3	8.5 ± 0.1 [†]
Diámetro de sección transversal (mm)	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1 [*]	0.9 ± 0.1 [†]
Razón músculo:cuerpo ($\times 10^{-4}$)	2.9 ± 0.2	3.8 ± 0.3	3.0 ± 0.3
Fuerza tetánica P_0/CSA (N/cm ²)	3.5 ± 0.6	4.6 ± 0.6	1.8 ± 0.6 [†]
Tiempo de fatiga (s)	41.0 ± 7.9	55.6 ± 11.2	14.8 ± 3.6 ^{*†}

Los símbolos *, * y † indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.016$) entre los grupos C y E, grupos C e I y grupos E e I, respectivamente.

Los promedios de los pesos corporales de la Tabla 4.3 fueron obtenidos al finalizar el periodo de monitorización de cada grupo; donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos. Los pesos musculares se midieron al terminar los registros mio-mecánicos, evidentemente los pesos de los *rectus femoris* fueron mayores que los pesos de los *soleus*. Para el músculo RF, el mayor peso muscular promedio

se obtuvo en el grupo C, un 26.9% más alto que en el grupo E y un 35.2% mayor que el grupo I. El promedio del diámetro de sección transversal también fue más grande en el grupo C, cerca de un 21.2% más grande que el diámetro de sección transversal promedio del grupo I y superando apenas en un 2.6% al diámetro del grupo E. Por el contrario, el promedio de la longitud óptima fue mayor en los grupos de entrenamiento e inmovilización, superando al grupo control en un 0.9%. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los pesos musculares, en las longitudes óptimas ni en los diámetros de sección transversal del músculo RF.

Para el *soleus*, el peso muscular promedio del grupo E fue un 42.6% mayor que el valor calculado para el grupo C y un 52.3% más grande que la media del peso muscular del grupo I. Para este músculo, los promedios de la longitud óptima de contracción y del diámetro de sección transversal también fueron mayores en el grupo de entrenamiento HIIT. En el caso de la longitud óptima se encontraron diferencias porcentuales del 1.1% y el 12.9% respecto a las medias del grupo C y del grupo I, respectivamente; mientras que, para el diámetro de sección transversal, las diferencias fueron del 30.8% y el 88.9%, también respectivamente. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los pesos musculares, pero sí se las encontró para las longitudes óptimas de contracción y los diámetros de sección transversal. Para las longitudes óptimas, las diferencias significativas se presentaron entre los grupos C e I ($p = 3.6 \times 10^{-4}$) y los grupos E e I ($p = 0.005$); mientras que, para los diámetros de sección transversal, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos C y E ($p = 0.005$) y los grupos E e I ($p = 3.3 \times 10^{-4}$).

Con los pesos corporales de los especímenes y los pesos de los músculos *rectus femoris* y *soleus* se calcularon las razones músculo:cuerpo. La razón entre los pesos musculares y corporales indican la proporción existente entre un determinado músculo y el peso corporal del animal; siendo este parámetro un mejor indicador para analizar los cambios morfológicos en los músculos al ser sometidos a diferentes condiciones experimentales. Evidentemente, los músculos más grandes presentarán una mayor razón músculo:cuerpo; de hecho, en este estudio en particular, las razones músculo:cuerpo obtenidas para el *rectus femoris* se encontraron en un orden de magnitud de 10^{-3} , mientras que en el *soleus* las razones se encontraron en un orden de 10^{-4} (Tabla 4.3). En el caso del músculo RF, la mayor razón músculo:cuerpo se obtuvo en el grupo control, un 24.6% más alta que la razón del grupo E y un 39.3% mayor a la razón promedio del grupo I; aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos. En el músculo *soleus* tampoco

se encontraron diferencias significativas entre las razones de los distintos grupos, pero en este caso, la máxima razón músculo:cuerpo se obtuvo en el grupo de entrenamiento HIIT, que fue un 30.4% más alta que la media obtenida para el grupo C y un 25.7% mayor que la razón promedio del grupo I.

Las estimulaciones mio-mecánicas de los músculos se realizaron aplicando el protocolo descrito en el Capítulo 3. Las tensiones máximas de contracción fueron registradas para cada frecuencia de estimulación. La tensión tetánica por área de sección transversal, P_0/CSA (N/cm²), se alcanzó entre las frecuencias de 40 y 80 Hz; no obstante, el análisis de la máxima tensión tetánica por CSA se realizó con los datos obtenidos en la frecuencia de estimulación de 80 Hz. Se registró el máximo valor de tensión tetánica por CSA para cada músculo en los distintos grupos y se tomó al promedio grupal como el indicador de análisis para cada grupo de estudio (Tabla 4.3). En el *rectus femoris*, la tensión tetánica por CSA promedio fue mayor en el grupo C, siendo un 11.5% más alta que la tensión obtenida en el grupo E y un 16.0% mayor que la obtenida en el grupo I. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las tensiones tetánicas por CSA del músculo RF de los distintos grupos. Para el músculo SOL, se observó una mayor tensión tetánica promedio en el grupo de entrenamiento HIIT, casi 1.3 veces más grande que el promedio obtenido en el grupo control; mientras que en el grupo de inmovilización se observó una tensión tetánica promedio más pequeña, alrededor de un 48.6% menor al promedio del grupo control. En este caso, las diferencias encontradas entre los grupos C y E y los grupos C e I no fueron estadísticamente significativas, pero sí las diferencias entre los grupos E e I, con un valor de significancia $p = 0.005$. La fatiga muscular también se analizó en la frecuencia de estimulación de 80 Hz. Los tiempos de fatiga del *rectus femoris* no mostraron diferencias significativas entre grupos, es más, la diferencia entre el grupo control y el grupo de inmovilización no superó el 0.9%, aunque sí se observó un tiempo de fatiga promedio más grande para el grupo de entrenamiento, superando al grupo control en un 27.7%. En el caso del músculo *soleus*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de fatiga del grupo de inmovilización y los tiempos obtenidos en los grupos control ($p = 0.011$) y de entrenamiento HIIT ($p = 0.005$). Para este músculo, también se obtuvo un tiempo de fatiga promedio más grande en el grupo de entrenamiento, superando el promedio del grupo control en 35.6%; mientras que en el grupo de inmovilización se obtuvo un tiempo de fatiga promedio mucho menor al de los otros dos grupos, alcanzando un 63.9% de diferencia con el grupo control.

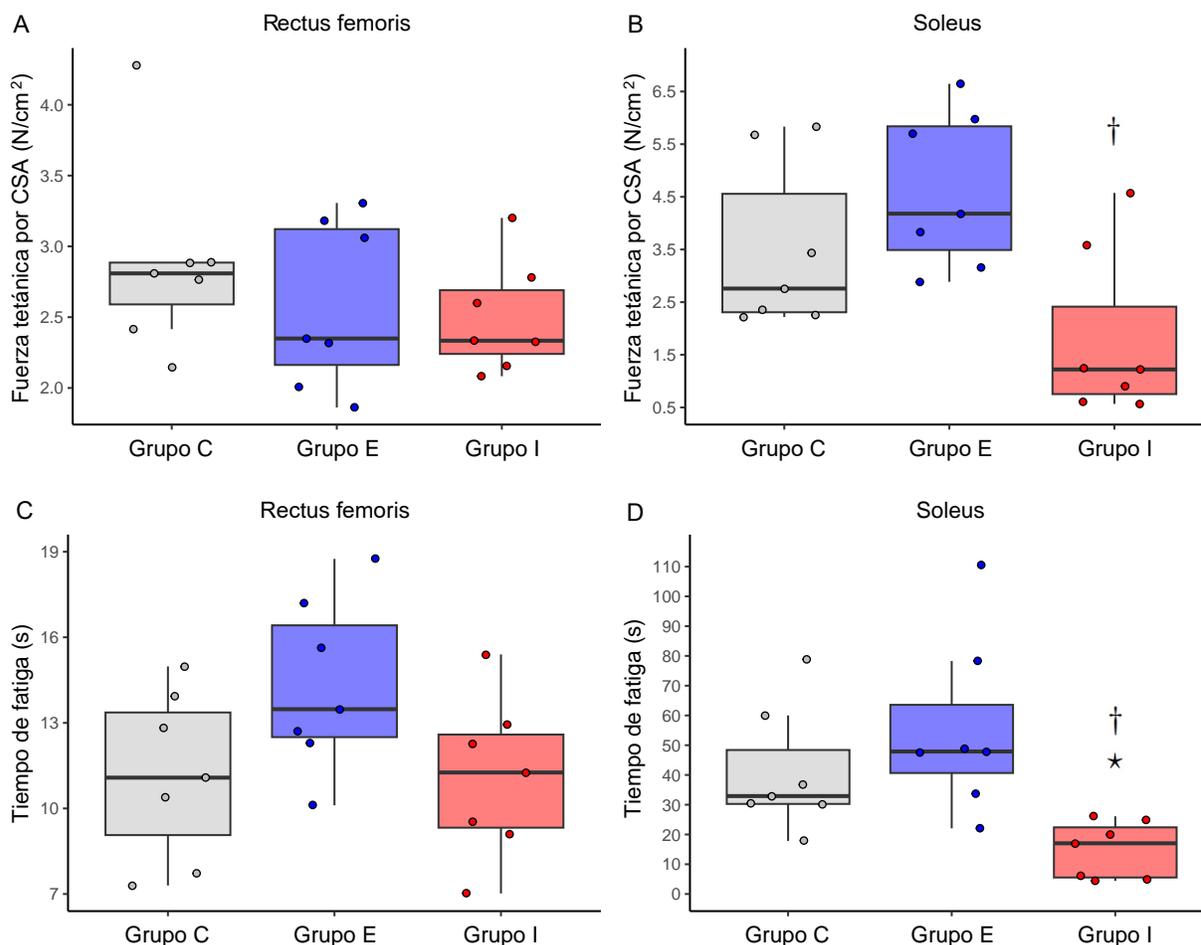


Figura 4.1: Parámetros de fuerza y fatiga muscular obtenidos en los registros mio-mecánicos: fuerza tetánica máxima por CSA (A) y tiempo de fatiga (C) para el músculo *rectus femoris* y fuerza tetánica máxima por CSA (B) y tiempo de fatiga (D) para el músculo *soleus*. Los símbolos *, * y † indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.016$) entre los grupos C y E, grupos C e I y grupos E e I, respectivamente.

La Figura 4.1 representa de manera gráfica los datos obtenidos para la fuerza tetánica máxima y los tiempos de fatiga en los músculos *rectus femoris* (Figura 4.1 A y C) y *soleus* (Figura 4.1 B y D). Los tamaños de los rangos intercuartiles (longitudes de las cajas) y los rangos de puntajes (longitudes de los bigotes) representan la dispersión de los datos; es decir, a mayores rangos de puntajes mayor será la dispersión. Las medianas están representadas por la línea gruesa en el interior de las cajas, su posición indica la forma en la que los datos están distribuidos: distribución con sesgo positivo si la mediana se encuentra cerca del primer cuartil, distribución con sesgo negativo si la mediana se aproxima al tercer cuartil y distribución simétrica cuando la mediana se ubica en el centro del rango

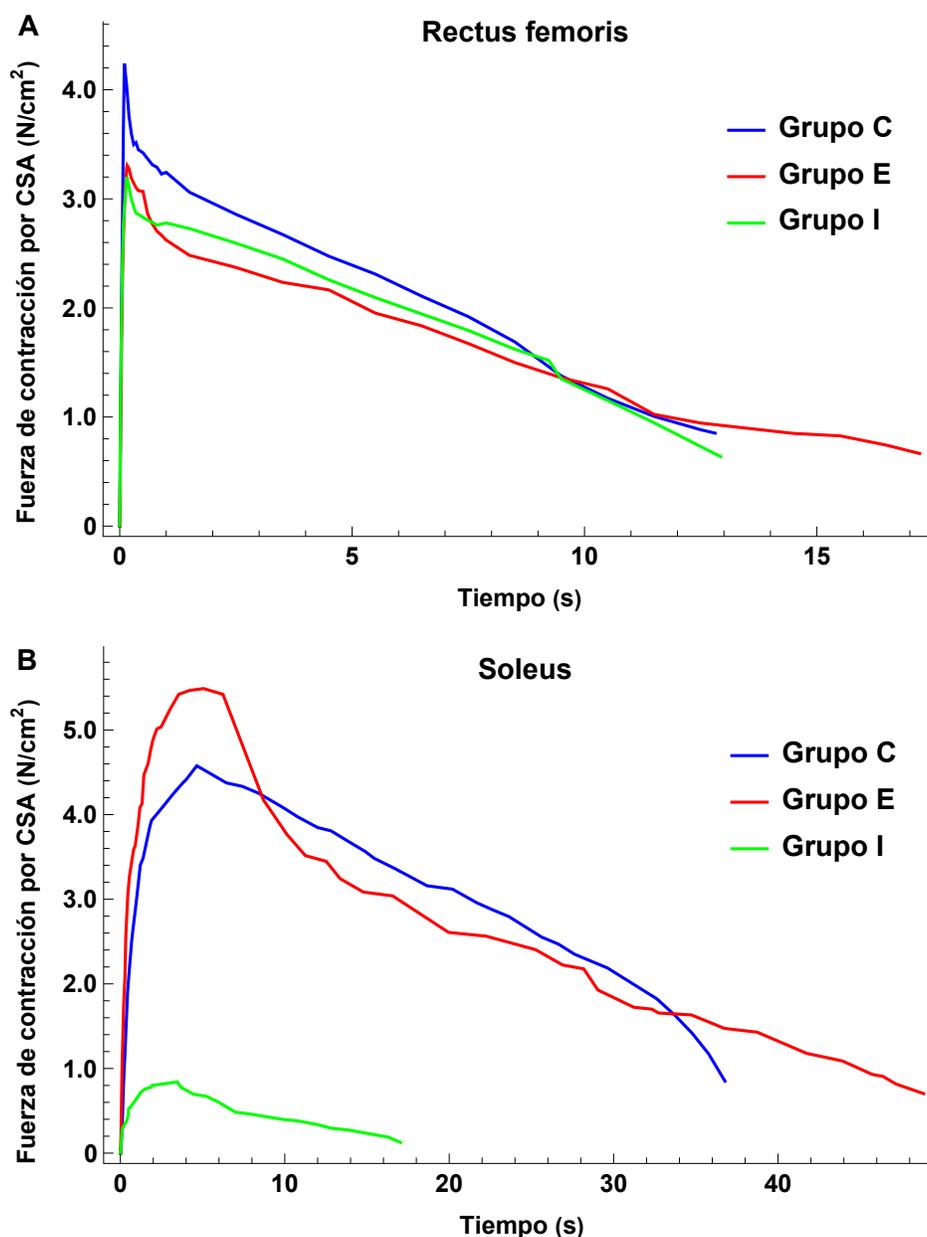


Figura 4.2: Curvas representativas de la fuerza de contracción por CSA en función del tiempo para estimulaciones mio-mecánicas a 80 Hz. En la gráfica se puede observar la fuerza tetánica y el tiempo de fatiga muscular para el *rectus femoris* (A) y *soleus* (B).

intercuartil. En la gráfica se muestran las diferencias significativas obtenidas en las pruebas estadísticas ANOVA que fueron descritas anteriormente; si bien las distribuciones son asimétricas, las varianzas son muy cercanas, por lo que aplicar ANOVA en estos datos es pertinente. También se observó la presencia de ciertos puntos atípicos en algunos casos, los cuales están representados por los puntos circulares ubicados fuera del rango de puntajes.

En la Figura 4.2 se muestran las curvas representativas de cada grupo para las estimulaciones mio-mecánicas realizadas sobre los músculos RF (Figura 4.2 A) y SOL (Figura 4.2 B) a una frecuencia de 80 Hz. La gráfica constituye un ejemplo del desarrollo de la fuerza contráctil en función del tiempo para las estimulaciones de máxima frecuencia. En la figura se pueden observar regiones de rápido ascenso en la fuerza mecánica de contracción, seguidas por zonas de fatiga donde la fuerza disminuye progresivamente. Las máximas fuerzas de contracción representan las fuerzas tetánicas por CSA de los músculos *rectus femoris* y *soleus*; mientras que los tiempos de fatiga muscular son representados por los tiempos totales de extensión de las curvas.

Las tensiones máximas registradas durante las estimulaciones mio-mecánicas fueron utilizadas para calcular las tensiones de contracción específica de cada músculo, que corresponden a las fuerzas máximas de contracción por CSA (Ecuación 3.4). Con las medidas promedio de la fuerza de contracción específica se contruyeron las curvas fuerza-frecuencia para los músculos RF (Figura 4.3 A) y SOL (Figura 4.3 B) en cada grupo de experimentación, incluyendo el grupo control. De manera general, las tensiones específicas calculadas fueron muy similares para estímulos de baja frecuencia, es decir, estímulos en el rango de 0.5 Hz a 20 Hz. Es a partir de los 20 Hz, cuando el fenómeno de sumación empieza a hacerse presente en las contracciones, que las diferencias entre las tensiones específicas se hacen más notorias.

Para el músculo RF, las fuerzas específicas del grupo C fueron mayores que las fuerzas desarrolladas por los grupos E e I, al menos dentro del rango de frecuencias de estimulación de 20 a 80 Hz. La mayor fuerza específica se alcanzó a los 40 Hz, con un valor de 3.2 ± 0.3 N/cm² para el grupo C, 2.8 ± 0.2 N/cm² para el grupo E y 2.9 ± 0.1 N/cm² para el grupo I, lo que equivale a diferencias porcentuales del 12.5% para los grupos C y E y del 9.4% entre los grupos C e I. A pesar de esto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las tensiones específicas; de hecho, las curvas de relación fuerza-frecuencia de los tres grupos fueron muy cercanas. Por el contrario, en el músculo SOL las diferencias entre las curvas de relación fuerza-frecuencia fueron más evidentes. Para este músculo, las mayores tensiones específicas se presentaron en el grupo E, seguidas por las tensiones del grupo C y, finalmente, las tensiones específicas del grupo I. En los grupos E e I las fuerzas específicas máximas se alcanzaron a los 40 Hz, con valores de 5.3 ± 0.7 N/cm² para el grupo E y 2.4 ± 0.6 N/cm² para el grupo I; para el grupo C, la máxima tensión específica se alcanzó en los 80 Hz, con un valor de 3.5 ± 0.6 N/cm². Solo

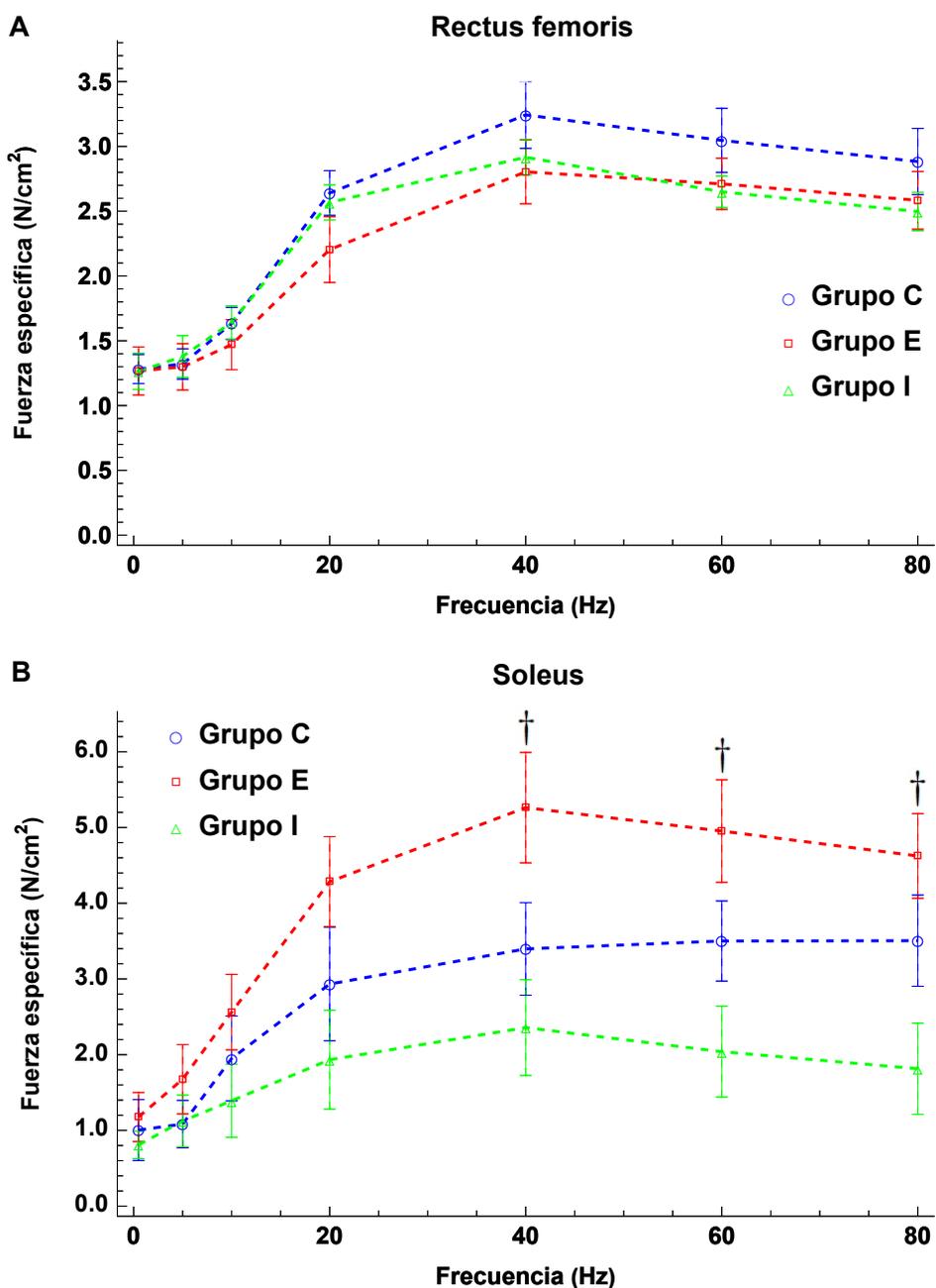


Figura 4.3: Registros mio-mecánicos de la fuerza de contracción específica en función de la frecuencia de estimulación para los músculos *rectus femoris* (RF) y *soleus* (SOL). El símbolo † indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.016$) entre los grupos E e I.

se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las tensiones de los grupos E e I para las frecuencias de estimulación de 40 ($p = 0.011$), 60 ($p = 0.007$) y 80 Hz ($p = 0.005$). Para la estimulación de 40 Hz, la fuerza específica de contracción del grupo E fue un 55.9% mayor que la del grupo control, mientras que la fuerza específica del grupo I

fue 29.4% menor. A 60 Hz las diferencias porcentuales entre las tensiones de los grupos experimentales y el grupo control fueron del 40.0% (grupos C y E) y el 42.9% (grupos C e I); repitiendo el mismo análisis para 80 Hz se obtuvieron diferencias del 31.4% (grupo C y E) y 48.6% (grupo C e I).

4.3. Tinciones histológicas e histoquímicas

Los cambios observados en la fuerza tetánica, el tiempo de fatiga muscular y las fuerzas específicas de los músculos *rectus femoris* y *soleus* son el resultado de las respuestas adaptativas que presentaron las fibras musculares ante las condiciones de entrenamiento e inmovilización al ser comparados con el grupo control. Si bien, en este estudio no se analizaron los mecanismos específicos por los cuales se producen las alteraciones celulares en los músculos, sí se determinaron los cambios morfológicos e histoquímicos que presentaron los tejidos musculares debido a los experimentos, utilizando tinciones H&E, NADH-TR y tricromía de Masson, pudiendo medir las siguientes propiedades: diámetro de las fibras musculares (diámetro mínimo de Feret), indicadores de necrosis (porcentaje de núcleos concéntricos), coeficiente de variabilidad, presencia de colágeno y porcentaje de fibras tipo I y tipo II. En la Tabla 4.4 se muestran los promedios de los parámetros histomorfométricos e histoquímicos.

Tabla 4.4: Medición de los parámetros histomorfométricos e histoquímicos en los músculos *rectus femoris* y *soleus*.

	Grupo C	Grupo E	Grupo I
<i>Rectus femoris:</i>			
Diámetro de fibra (μm)	40.5 \pm 3.8	30.9 \pm 3.4*	24.0 \pm 2.2*†
Variabilidad	93.8	110.0	91.7
Núcleos concéntricos (%)	0.46 \pm 0.07	0.76 \pm 0.12	1.88 \pm 0.24*†
Porcentaje de fibras tipo I (%)	33.56 \pm 2.03	36.19 \pm 0.85	37.72 \pm 1.74
Porcentaje de fibras tipo II (%)	66.44 \pm 2.03	63.81 \pm 0.85	62.28 \pm 1.74
<i>Soleus:</i>			
Diámetro de fibra (μm)	30.4 \pm 2.0	23.5 \pm 1.6*	15.3 \pm 1.2*†
Variabilidad	65.8	68.1	78.4
Núcleos concéntricos (%)	0.73 \pm 0.06	1.63 \pm 0.21*	2.06 \pm 0.30*
Porcentaje de fibras tipo I (%)	74.11 \pm 2.05	72.55 \pm 1.61	62.67 \pm 1.24*†
Porcentaje de fibras tipo II (%)	25.89 \pm 2.05	27.45 \pm 1.61	37.33 \pm 1.24*†

Los símbolos *, * y † indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.016$) entre los grupos C y E, grupos C e I y grupos E e I, respectivamente.

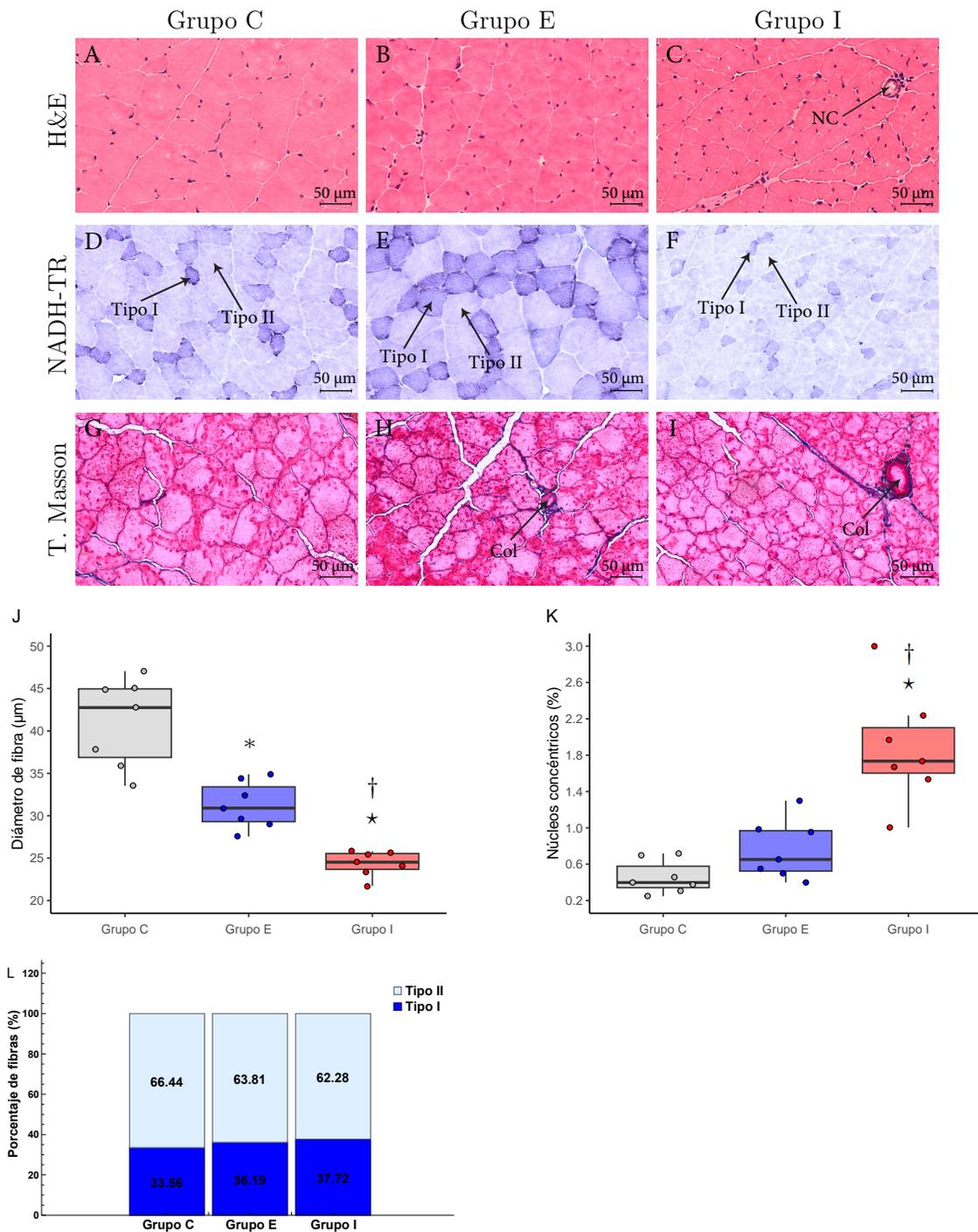


Figura 4.4: Análisis histomorfométrico del músculo *rectus femoris*. Imágenes representativas (1200 × 740 píxeles) H&E (A,B y C), NADH-TR (D,E y F) y tricromía de Masson (G,H e I). Gráficas de los diámetros de fibra (J), núcleos concéntricos (K) y porcentajes de fibras tipo I y II (L). Los símbolos *, * y † indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.016$) entre los grupos C y E, grupos C e I y grupos E e I, respectivamente. **NC:** núcleos concéntricos y **Col:** colágeno

En la Figura 4.4 y la Figura 4.5 se muestran las imágenes representativas de los cortes histológicos, así como el análisis histomorfométrico de los músculos *rectus femoris* (Figura 4.4) y *soleus* (Figura 4.5). En el control, el diámetro promedio de las fibras del músculo RF fue 1.3 veces más grande que el promedio registrado para el músculo SOL, lo cual es consistente con las proporciones de fibras tipo I y tipo II en ambos músculos, aproximadamente 34 %-66 % para el músculo RF y 74 %-26 % para el músculo SOL [98, 101, 103]. Otra observación importante es que los coeficientes de variabilidad de los músculos RF y SOL en todos los grupos se encontraron por debajo de 250; esto significa que los músculos no presentaron heterogeneidades importantes en los diámetros de sus fibras, algo común en lesiones musculares localizadas [121].

Para el músculo *rectus femoris*, el promedio de los diámetros de las fibra musculares fue mayor en el grupo C, superando los promedios de los grupos E e I en un 31.1 % y un 68.8 %, respectivamente. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diámetros de fibra de todos los grupos: control y entrenamiento ($p = 9.0 \times 10^{-4}$), control e inmovilización ($p = 3.2 \times 10^{-6}$) y entrenamiento e inmovilización ($p = 8.3 \times 10^{-5}$). El porcentaje de núcleos concéntricos fue mayor en el grupo I, alrededor de 2.5 veces más alto que el porcentaje del grupo E y 4.1 veces mayor al porcentaje promedio del grupo C; en este caso, las diferencias significativas se presentaron entre los grupos C e I ($p = 8.8 \times 10^{-5}$) y los grupos E e I ($p = 0.001$). Por otro lado, los porcentajes de fibras lentas y rápidas no mostraron diferencias significativas entre grupos; de hecho, los promedios porcentuales de fibras tipo I y II fueron muy cercanos entre los distintos grupos. Sin embargo, en el grupo I se observó un porcentaje ligeramente menor de fibras rápidas, alrededor de un 62.3 %, seguido del grupo E con un 63.8 % y el grupo C con un 66.4 %.

En el músculo *soleus*, el diámetro promedio de las fibras musculares también fue mayor en el grupo C, aproximadamente un 29.4 % más alto que el diámetro promedio del grupo E y un 98.7 % más grande que el promedio del grupo I. Al igual que en el músculo RF, el porcentaje de núcleos concéntricos del músculo SOL fue mayor en el grupo I, aproximadamente 1.3 veces más grande que el porcentaje del grupo E y 2.8 veces mayor al porcentaje del grupo C. Los diámetros de fibras mostraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos: control y entrenamiento ($p = 6.5 \times 10^{-5}$), control e inmovilización ($p = 1.8 \times 10^{-8}$) y entrenamiento e inmovilización ($p = 4.0 \times 10^{-10}$). Para los porcentajes de núcleos concéntricos solo se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos C y E ($p = 0.001$) y los grupos C e I ($p = 0.001$).

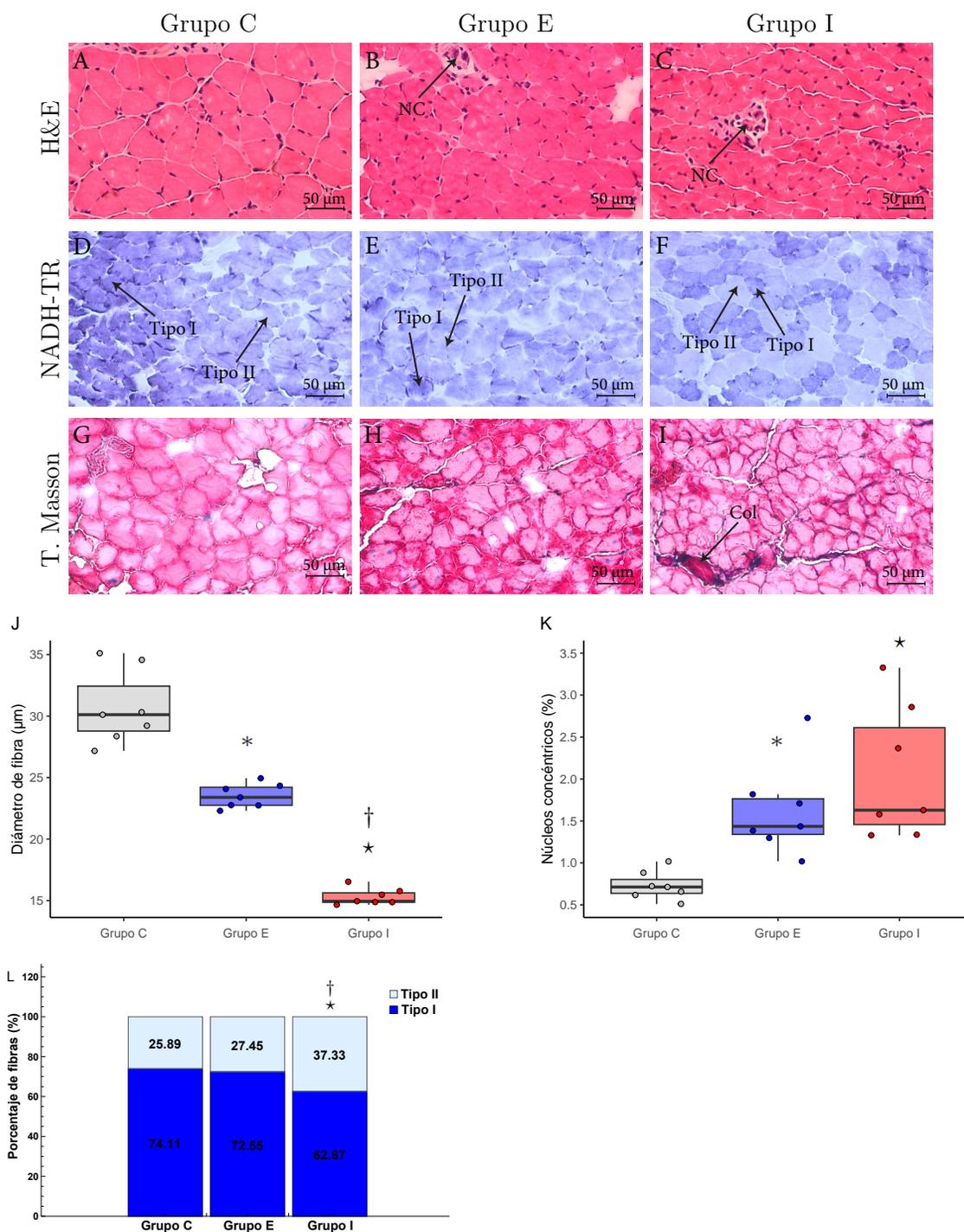


Figura 4.5: Análisis histomorfométrico del músculo *soleus*. Imágenes representativas (1000 × 620 píxeles) H&E (A,B y C), NADH-TR (D,E y F) y tricromía de Masson (G,H e I). Gráficas de los diámetros de fibra (J), núcleos concéntricos (K) y porcentajes de fibras tipo I y II (L). Los símbolos *, * y † indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.016$) entre los grupos C y E, grupos C e I y grupos E e I, respectivamente. **NC:** núcleos concéntricos y **Col:** colágeno

En cuanto a los porcentajes promedio de fibras lentas y rápidas, el grupo control fue el que presentó un mayor porcentaje de fibras tipo I, aproximadamente un 74.1%, seguido del grupo de entrenamiento con un 72.6% y el grupo de inmovilización con un 62.7% (Tabla 4.4). Para los tipos de fibras, las diferencias estadísticamente significativas se presentaron entre los grupos C e I ($p = 4.5 \times 10^{-4}$) y los grupos E e I ($p = 3.9 \times 10^{-4}$).

Las tricromías de Masson (Figura 4.4 G - I y Figura 4.5 G - I) no mostraron regiones teñidas de amarillo en ninguno de los músculos estudiados, por lo tanto, no se pudo analizar la presencia de fibrosis en los cortes histológicos obtenidos; sin embargo, sí se observaron ciertas áreas teñidas en azul, las cuales representan la presencia de colágeno en los músculos. La presencia de colágeno en los cortes histológicos fue analizada de manera cualitativa. Para el *rectus femoris* se observó una mayor presencia de colágeno en el grupo de inmovilización, comparándola con el colágeno presente en los grupos control y entrenamiento HIIT. El grupo control, por el contrario, fue el que mostró la menor presencia de colágeno de los tres grupos. En el *soleus*, el grupo de entrenamiento fue el que exhibió la menor presencia de colágeno de todos los grupos; mientras que el grupo de inmovilización fue el que mostró la mayor presencia de colágeno.

4.4. Discusión

En este trabajo se emplearon ratones hembra de la cepa C57BL/6J para la implementación de modelos de inmovilización y HIIT de resistencia, analizando los cambios morfológicos y funcionales de dos músculos esqueléticos (*rectus femoris* y *soleus*) a nivel histológico, histoquímico y mio-mecánico, aunque la metodología establecida en este estudio tiene aplicación para ambos sexos. Se sabe que tanto los hombres como las mujeres están expuestos a situaciones de entrenamiento muscular e inmovilización de extremidades, sobre todo aquellas personas que se dedican al deporte de manera profesional [12, 122, 123]. Ambas condiciones producen cambios adaptativos en los músculos esqueléticos por medio de alteraciones de las características morfológicas, metabólicas y funcionales de las fibras musculares. Trabajos como los de Hostrup *et al.*, y Luo *et al.*, abordan las implicaciones fisiológicas de los cambios celulares experimentados por los músculos esqueléticos humanos en condiciones de entrenamiento HIIT e inmovilización, respectivamente [124, 125]. Sin embargo, realizar estudios del músculo esquelético en humanos no suele ser un proceso sencillo. Existen muchas consideraciones bioéticas para el uso de pacientes humanos como

sujetos de prueba, además de que los procedimientos experimentales que se realizan pueden tener consecuencias en la calidad de vida de los participantes; por lo tanto, una mejor estrategia para la investigación de los cambios musculares es el empleo de modelos animales, en particular, los ratones [8, 9]. Los modelos animales también presentan aspectos bioéticos que deben cumplirse, pero en esos casos las consideraciones son menos estrictas que las estipuladas en la experimentación con humanos.

Por otro lado, considerando que las condiciones de entrenamiento e inmovilización pueden presentarse en ambos sexos, es necesario que los modelos preclínicos que estudian los músculos esqueléticos en estas situaciones especiales no se concentren únicamente en un sexo en particular. La mayoría de los estudios en músculo esquelético seleccionan murinos machos para la realización de los estudios y experimentos musculares [26, 27, 32, 105]. Las razones por las cuales persiste esta preferencia son variadas, pero la principal es la variación hormonal existente entre los distintos sexos [8, 126]. Los ratones hembra, incluso las hembras envejecidas, producen más estrógeno para consumo interno que los ratones machos [127]. Esta hormona es considerada como agente protector del estrés oxidativo y la inflamación en el tejido adiposo [8], lo cual afectaría la experimentación muscular, especialmente aquellos experimentos que modelan la atrofia muscular. Otra de las razones por las que se evita utilizar ratones hembras es porque presentan cambios cíclicos estrales que provocan una variación temporal de la concentración de las hormonas sexuales [128]. No obstante, la selección del sexo de los murinos con base a la diferencia hormonal es controversial, sobre todo si se considera que existen hormonas en los ratones machos que también afectan los tejidos musculares. La testosterona, por ejemplo, es una hormona producida en los ratones machos que puede provocar aumentos significativos en el área transversal de las fibras musculares, promoviendo la hipertrofia tanto en los músculos oxidativos como en los músculos glucolíticos [129]. Además, se sabe que en el ámbito clínico las mujeres muestran una mayor incidencia de padecimientos de dolor crónico, como dolor de cabeza, osteoartritis, artritis reumatoide, síndrome del intestino irritable y fibromialgia [130], lo cual influye en la capacidad para realizar actividades físicas en las mujeres afectando al tejido muscular. En este sentido, resulta importante estudiar los efectos del desuso y el entrenamiento en los músculos esqueléticos de las mujeres, y es posible que una de las estrategias adecuadas para este tipo de estudios sea el empleo de hembras en el ámbito preclínico. Por lo tanto, en algunos casos no se justifica la selección de ratones machos para los modelos de experimentación muscular; es más, en ciertos modelos

específicos, esta preferencia posiblemente constituiría un sesgo metodológico no muy bien fundamentado. Afortunadamente, ya se han reportado estudios que analizan los cambios musculares en ratones hembras bajo distintos modelos de experimentación. De hecho, investigaciones preclínicas como las de Masschelein *et al.*, Foresto *et al.*, Seldeen *et al.* y Yamada *et al.*, publicadas en los últimos años, ya han analizado los cambios musculares experimentados por murinos hembra bajo modelos de inmovilización y entrenamiento [4, 18, 65, 131], mostrando la posibilidad de aplicar estos modelos en hembras y obteniendo cambios morfológicos y funcionales en los músculos esqueléticos en tiempos relativamente cortos.

Durante el tiempo de entrenamiento se monitorizaron las ingestas de comida y agua, los pesos corporales y diferentes parámetros morfométricos. Como era de esperarse, el HIIT de resistencia demandó el mayor consumo de líquido en los animales, lo cual puede deberse a la deshidratación experimentada por los especímenes como resultado del régimen de entrenamiento. En contraste, el consumo de alimento en el grupo E fue menor que el registrado en el grupo control; este resultado se justifica al tener en consideración que los entrenamientos de resistencia no estimulan la hipertrofia en los músculos, por lo que es posible que los especímenes entrenados no hayan experimentado la necesidad de aumentar su ingesta de comida para la generación de masa muscular. Además, existe evidencia de que los HIIT reducen la resistencia a la glucosa, lo cual disminuye la sensación de hambre y sed en los especímenes entrenados [132]. Los consumos de agua y comida en el grupo E mostraron tendencias decrecientes, a partir de la primera semana en el caso del consumo de líquido y después de la segunda semana en el caso de los alimentos. Esto indica que la necesidad de agua y comida en los especímenes entrenados disminuye a lo largo de las semanas conforme los animales se adaptan al régimen de entrenamiento, aunque se espera que estas disminuciones terminen al alcanzar el equilibrio entre la actividad física y el requerimiento nutricional. Los consumos de alimento obtenidos para el grupo E son consistentes con los resultados reportados en los trabajos de Henríquez-Olguín *et al.*, Motta *et al.* y Pimenta *et al.*, en los cuales tampoco se encontraron diferencias significativas entre las ingestas de los ratones sometidos a HIIT y los ratones control [132–134], aunque solo en la investigación de Motta *et al.* la ingesta de alimento de los animales entrenados fue menor al control, lo cual puede estar asociado con el mejoramiento de la resistencia a la glucosa. Por otro lado, los consumos de agua concuerdan con lo reportado en el estudio de Wang *et al.*, en donde se indica que el promedio del consumo de agua en ratones entrenados con

HIIT es mayor al obtenido en un grupo control [135]. Es posible que el tipo de protocolo HIIT implementado influya en el consumo de alimento y agua de los especímenes, ya que en un estudio desarrollado por Seldeen *et al.* sí se encontró un aumento significativo en la ingesta cuando los ratones fueron sometidos a un protocolo HIIT enfocado en el aumento de la masa muscular [27].

Los promedios de los pesos corporales de los animales del grupo E mostraron incrementos y decrementos a lo largo de las semanas de entrenamiento, sin presentarse diferencias significativas respecto al promedio inicial. En cuanto a los parámetros morfométricos, se observaron decrementos sostenidos en los diámetros y los perímetros del muslo y la pantorrilla en el transcurso de las semanas, siendo los promedios de la última semana los más pequeños. Dado que los HIIT de resistencia generan tono muscular, resistencia a la fatiga y procesos de conversión de fibras tipo II a tipo I [58], sin provocar hipertrofia o aumento del volumen muscular, es de esperarse que los músculos sometidos a este tipo de entrenamientos experimenten una disminución en sus tamaños y pesos. Es importante recalcar que, tanto para los pesos corporales como para los parámetros morfométricos, las diferencias encontradas entre el grupo E y el grupo C pueden no estar relacionadas directamente con el HIIT, sino con la variación de los tamaños y los pesos de los especímenes en las diferentes camadas. Aún así, es claro que el HIIT de resistencia implementado sí provocó alteraciones morfométricas en el diámetro de la pantorrilla y los perímetros del muslo y la pantorrilla de los especímenes, algo que no se observó en el grupo control. En este trabajo, los músculos *rectus femoris* de los especímenes entrenados mostraron una disminución en el peso, el diámetro de sección transversal y la razón músculo:cuerpo, en comparación con los músculos del grupo control; mientras que los músculos *soleus* de los animales entrenados mostraron condiciones contrarias. Esto puede estar relacionado con las diferencias existentes en la composición de las fibras tipo I y tipo II de los músculos RF y SOL. El músculo RF contiene aproximadamente un 70% de fibras tipo II, mientras que el músculo SOL contiene cerca de un 30% de fibras tipo II. Los HIIT de resistencia afectan principalmente a los músculos lentos compuestos mayoritariamente por fibras tipo I. No todas las fibras de los músculos esqueléticos son activadas al mismo tiempo durante este tipo de entrenamientos, de hecho, las primeras fibras en contraerse son las fibras tipo I, mientras que la activación de las fibras tipo II se produce a medida que la intensidad del ejercicio aumenta, obedeciendo el *principio del tamaño* [63]. Los incrementos en los promedios del peso muscular y la razón músculo:cuerpo de los músculos *soleus* de los ratones

hembra entrenados no fueron significativos, pero sí el aumento en el promedio del diámetro de sección transversal, lo cual puede atribuirse a la formación de nuevos capilares en los músculos. Se sabe que los entrenamientos de resistencia no generan hipertrofia, aunque sí estimulan la biogénesis mitocondrial y la angiogénesis¹³ en los músculos esqueléticos [70]; la formación de nuevos capilares mejora la capacidad aeróbica de los músculos, incrementando la circulación sanguínea y promoviendo la síntesis de Fgf21 que promueve la regeneración muscular a través de la regulación por las células satélite [58], lo cual podría resultar en el aumento del peso muscular, el diámetro de la sección transversal y la razón músculo:cuerpo en el músculo SOL. Estos resultados concuerdan en parte con lo reportado en otro trabajo realizado por Seldeen *et al.*, en el cual se encontraron reducciones significativas en los pesos corporales de ratones hembra sometidas a un HIIT de 8 semanas [131]. También en un estudio realizado por Chavanelle *et al.*, se obtuvieron menores pesos corporales en especímenes sometidos a un HIIT de 10 semanas, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas al compararlas con el control; en ese trabajo se analizó el peso muscular del músculo *gastrocnemius* obteniéndose un menor peso muscular y una mayor razón músculo:cuerpo para los músculos entrenados [137]. En otro estudio realizado por Li *et al.* se analizaron los cambios musculares experimentados por ratas sometidas a un protocolo HIIT de 10 semanas en comparación con ratas sedentarias, observando disminuciones en los promedios para el peso corporal y las masas musculares del *quadriceps* y el *soleus*, pero las razones músculo:cuerpo de esos músculos incrementaron su promedio [138]. Es importante tener en consideración que no todos los músculos esqueléticos presentarán los mismos cambios porcentuales en su peso y área de sección transversal, por lo que no necesariamente las disminuciones en el peso muscular y en el peso corporal implican una reducción en la razón músculo:cuerpo.

Con el HIIT de resistencia implementado, el músculo *rectus femoris* experimentó una reducción considerable en el diámetro de sus fibras, lo que es consistente con las reducciones observadas en el peso muscular, el diámetro de sección transversal y la razón músculo:cuerpo, aunque estas tres últimas no fueron estadísticamente significativas respecto al grupo control. El músculo *rectus femoris* está conformado mayoritariamente por fibras tipo II, en este tipo de fibras los HIIT de resistencia provocan un aumento en la biogénesis mitocondrial, acompañada del incremento de ciertas enzimas y proteínas que participan en la homeostasis metabólica, como el NAD⁺, la SIRT1 y la Fgf21, las cuales pueden

¹³La angiogénesis es el desarrollo fisiológico o patológico de la revascularización de los vasos sanguíneos en los tejidos [136].

inducir la conversión de fibras tipo II a tipo I [58, 63]. Esto podría dar explicación a los cambios observados en los diámetros de las fibras, la fuerza tetánica por CSA y las fuerzas específicas del músculo RF, aunque las tinciones NADH-TR no mostraron un aumento significativo en el porcentaje de fibras lentas respecto al control. Para este músculo, la reducción del tamaño de las fibras está relacionada con la disminución de la fuerza de contracción, ya que los entrenamientos de resistencia no estimulan la síntesis de proteínas en las fibras tipo II, ni el desarrollo de fuerza muscular, sino más bien la conversión de fibras tipo II a tipo I; por lo tanto, se esperaba que la fuerza tetánica por CSA y las fuerzas específicas de los músculos RF entrenados muestren una disminución respecto al control, aunque estas diferencias no fueron significativas en este estudio. En el músculo *soleus* también se observó una reducción significativa en los diámetros de las fibras después del entrenamiento; en este caso, la reducción del promedio de los diámetros puede estar relacionada con la disminución de los diámetros de las fibras tipo II que conforman los músculos, ya que no se espera que los diámetros de las fibras tipo I sufran cambios significativos en sus tamaños. El músculo *soleus* está conformado mayoritariamente por fibras tipo I, en este tipo de fibras los HIIT de resistencia suelen provocar modificaciones en el metabolismo debido a la gran demanda de energía que estos entrenamientos requieren; además el incremento de Fgf21 interactúa con la vía PGC-1 α /AMPK involucrada en la fisiología muscular, incrementando en las relaciones celulares de ADP/ATP [58, 63]. El incremento de las relaciones ADP/ATP en las fibras tipo I derivan en un aumento de las velocidades de los ciclos de puentes cruzados de las fibras, incrementando la fuerza de contracción muscular del *soleus*; lo cual daría explicación al aumento de la fuerza tetánica por CSA y las fuerzas específicas observadas en este músculo, a pesar de que el promedio del diámetro de las fibras disminuyó. Los cambios metabólicos experimentados por las fibras tipo I de los músculos oxidativos pueden sugerir una posible conversión del tipo fibras, aún así, no se han reportado estudios en los que se observe cambios de fibras tipo I a tipo II por medio de la aplicación de entrenamientos HIIT de resistencia, sino más bien lo contrario [58, 139]. En este trabajo no se observaron cambios significativos en los porcentajes de las distintas fibras del músculo SOL, aunque se obtuvo una pequeña disminución del porcentaje de fibras tipo I respecto al control, lo cual puede atribuirse a la variabilidad propia de los organismos vivos. Tanto el músculo *rectus femoris* como el músculo *soleus* presentaron un mayor porcentaje de núcleos concéntricos comparado con el control; la presencia de núcleos concéntricos en los cortes transversales de los músculos son un indicador de necrosis celular, derivada de la remodelación muscular. Los entrenamientos HIIT de resistencia

no solo producen cambios adaptativos en las fibras musculares, también pueden provocar lesiones en el músculo esquelético que son recuperadas mediante macrófagos M1 y M2 que se infiltran principalmente en los sitios necróticos del músculo [26]. La presencia de colágeno también es un indicador de daño y recuperación muscular, que viene acompañada por la formación de tejido conectivo y fibrosis [110]; en este caso, el músculo *soleus* mostró una menor presencia de colágeno respecto al control, mientras la presencia de colágeno en el músculo *rectus femoris* fue mayor, lo que indica que los músculos lentos presentan más beneficios con los HIIT de resistencia que los músculos rápidos. Finalmente, los tiempos de fatiga medidos en los músculos RF y SOL fueron mayores que los obtenidos en el grupo control; esto indica que los cambios adaptativos y metabólicos de los músculos entrenados los vuelve menos susceptibles a la fatiga, permitiéndoles realizar contracciones musculares durante más tiempo, lo cual es precisamente el resultado esperado de los entrenamientos de resistencia, tal como lo reportan Yamada *et al.* y Hughes *et al.* [64, 65, 140]. En lo referente a los parámetros histomorfométricos e histoquímicos, nuestros resultados contrastan con lo reportado por Seldeen *et al.* y Krüger *et al.*, quienes indican mayores promedios de diámetro de fibra para los músculos entrenados con HIIT (*soleus*) y carrera de resistencia (*rectus femoris* y *soleus*), respectivamente [27, 139]; sin embargo, en esos estudios también se reportan cambios significativos en el tipo de fibras musculares, específicamente por procesos de conversión de fibras tipo II a tipo I, lo cual resulta algo contradictorio considerando que las fibras tipo I presentan menores diámetros que las fibras tipo II. En cuanto a la presencia de núcleos concéntricos, las investigaciones de Zuo *et al.* y Damal *et al.* reportan resultados similares a los obtenidos en este trabajo, hallándose mayor presencia de núcleos concéntricos y fibras necróticas en especímenes entrenados [26, 141]. En otro estudio, realizado por Goh *et al.*, no se encontraron diferencias en la presencia de colágeno de los músculos de ratones entrenados comparándolos con los músculos de ratones sedentarios, ni tampoco se encontró presencia de fibrosis, siendo estos resultados consistentes con los nuestros [9]. En lo que respecta a las características mio-mecánicas, la literatura presenta resultados relativamente consistentes con lo obtenido en este estudio. Por un lado, en el estudio de Baati *et al.* se demuestra que las fuerzas de contracción de los músculos rápidos de ratones sometidos a HIIT son menores que las fuerzas de contracción de los músculos de ratones no entrenados, pero las disminuciones son dependientes del sexo, siendo más pronunciadas en los especímenes machos [142]. Por otra parte, los trabajos de Goh *et al.*, Olesen *et al.* y Yamada *et al.* muestran incrementos en las fuerzas de contracción de los músculos esqueléticos intermedios y lentos pertenecientes a ratones

entrenados con HIIT o con carreras de resistencia, en comparación con los músculos de ratones no entrenados [9, 25, 65]. Finalmente, las investigaciones realizadas por Seldeen *et al.* y Yamada *et al.* demostraron que los músculos esqueléticos de especímenes entrenados con HIIT presentan tiempos de fatiga muscular más grandes que los músculos de animales no entrenados, lo que implica que los músculos esqueléticos de los especímenes entrenados son más resistentes a la fatiga muscular [27, 64, 65, 131]. En todo caso, lo encontrado en la literatura sugiere que los cambios en las características musculares, los pesos corporales y los parámetros morfométricos dependen del tipo de entrenamiento, el periodo de realización del ejercicio, su periodicidad, la especie, el sexo y la cepa de los animales entrenados y el tipo de músculo bajo estudio.

Durante el tiempo de inmovilización también se monitorizaron las ingestas de alimento y agua, los pesos corporales y los parámetros morfométricos, con la diferencia de que los parámetros morfométricos se midieron al inicio y al final del experimento. De manera general, las ingestas de líquido y alimento son variables conductuales en los ratones que pueden ser afectadas por las condiciones de inmovilización y entrenamiento muscular. Para el caso de la inmovilización, tampoco se encontraron diferencias significativas entre las ingestas de los grupos C e I, ni entre los consumos registrados semanalmente dentro del grupo I. El menor consumo de alimento se presentó en el grupo I, aunque con aumentos progresivos en los promedios obtenidos al final de cada semana, lo que indica que la ingesta aumenta conforme los especímenes se acostumbran a la inactividad física. El consumo de agua, por el contrario, fue mayor en el grupo de inmovilización en comparación con el grupo control. La razón por la que la ingesta de comida fue menor en el grupo I puede deberse a la susceptibilidad de los especímenes a presentar un comportamiento depresivo inducido por el estrés de la inmovilización [143]. Los consumos obtenidos son consistentes con los resultados de Onda *et al.*, Cao *et al.* y Tomiya *et al.*, los cuales indican que las ingestas de los especímenes inmovilizados son menores o iguales a las ingestas de los sujetos control, sin presentarse diferencias estadísticamente significativas. [112, 143, 144].

Los pesos corporales de los especímenes inmovilizados también mostraron incrementos y decrementos a lo largo de las semanas de monitorización, aun así, el mayor promedio del peso corporal se alcanzó en la última semana de monitoreo. Tal como se esperaba, los parámetros morfométricos al final de la inmovilización fueron menores que los parámetros iniciales, lo cual puede estar relacionado con la atrofia muscular. En este caso, la variación

en los tamaños de los especímenes de las diferentes camadas también puede estar relacionada con las diferencias encontradas en los pesos corporales y los parámetros morfométricos del grupo I y del grupo C. Una posible estrategia para garantizar la homogeneidad en los grupos experimentales es formar los grupos C, E e I con especímenes de pesos similares, sin embargo, el preseleccionar los sujetos experimentales puede constituir un sesgo metodológico inadecuado para este caso. También es importante mencionar que, a pesar de que las disminuciones observadas en los parámetros morfométricos de los animales de los grupos E e I son cualitativamente las mismas, las causas fisiológicas de estas disminuciones responden a procesos distintos. Para este modelo en específico, la inactividad física derivada de la inmovilización puede provocar atrofia en los músculos esqueléticos; por lo tanto, es posible que los músculos inmovilizados experimenten una disminución en la tasa de síntesis de proteínas o un aumento en la degradación de proteínas [18], lo cual deriva en la disminución de sus masas musculares. Tanto el músculo *rectus femoris* como el músculo *soleus* mostraron menores promedios en sus pesos musculares y diámetros de sección transversal, en comparación con los promedios correspondientes del grupo control. Sin embargo, solo la razón músculo:cuerpo del músculo RF fue menor a la del control, mientras que la razón músculo:cuerpo del músculo SOL fue ligeramente mayor al control; este pequeño aumento puede deberse a que los pesos de los ratones hembra del grupo de inmovilización fueron menores que los del grupo control, además de que la diferencia no superó el 4% y no fue estadísticamente significativa. Todos estos resultados son consistentes con lo reportado en los estudios de Foresto *et al.*, Kawanishi *et al.* y Onda *et al.* [18, 32, 112].

Con el modelo de inmovilización implementado, los músculos RF y SOL experimentaron una reducción significativa en el diámetro de sus fibras, no solo al compararlas con el grupo control, sino también con el grupo de entrenamiento HIIT. Independientemente del mecanismo celular desencadenante, la inmovilización de los músculos esqueléticos siempre se caracteriza por la disminución del diámetro de las fibras musculares, el contenido de proteínas, la producción de fuerza y la resistencia a la fatiga [145, 146]. La reducción en el diámetro de las fibras del músculo RF también se ve reflejada en las disminuciones del peso muscular, el diámetro de la sección transversal y la razón músculo:cuerpo, todas comparadas con el grupo control. Por otro lado, se sabe que los modelos de inmovilización provocan una atrofia más pronunciada en los músculos oxidativos lentos compuestos mayoritariamente por fibras tipo I, acompañada por un proceso de conversión de fibras de tipo I a tipo II [18, 75, 146]. Esto se verificó en las tinciones NADH-TR del músculo

SOL, al observarse una reducción significativa en el porcentaje de fibras lentas respecto al control, algo que no ocurrió en el músculo RF, el cual no presentó variaciones significativas en los porcentajes de sus fibras rápidas y lentas. Es importante mencionar que las fibras tipo II pueden clasificarse en fibras tipo IIb (fibras intermedias) y tipo IIa (fibras rápidas), por lo que el proceso de conversión de fibras de tipo I a tipo II no necesariamente significa que las fibras lentas experimentan un cambio drástico en sus diámetros. En cuanto a los registros mio-mecánicos, tanto el músculo *rectus femoris* como el músculo *soleus* se vieron afectados por la atrofia muscular, indicando que la reducción de los diámetros de las fibras tiene consecuencias funcionales que repercuten sobre la fuerza de contracción y la fatiga muscular. Por un lado, las fuerzas tetánicas de ambos músculos disminuyeron significativamente sus magnitudes respecto a las fuerzas medidas en el control, lo cual se ve reflejado en la disminución de las fuerzas específicas; por otro, los tiempos de fatiga de los músculos también se vieron reducidos respecto al grupo control, sugiriendo que los periodos de inmovilización vuelven a los músculos RF y SOL más susceptibles a la fatiga. Las reducciones más notorias y significativas se presentaron en el músculo SOL, comprobando que los músculos más afectados por la inmovilización son los que contienen una mayor cantidad de fibras tipo I. Por último, tanto el músculo *rectus femoris* como el músculo *soleus* presentaron un mayor porcentaje de núcleos concéntricos y una mayor presencia de colágeno que el grupo control, incluso mayor que lo observado en el grupo de entrenamiento HIIT. Esto indica que la inmovilización de los músculos esqueléticos provocó una mayor cantidad de procesos de regeneración y degeneración muscular, en comparación con los entrenamientos HIIT de resistencia. Todos los resultados concuerdan con lo reportado en los estudios de Foresto *et al.*, Venojärvi *et al.*, Honda *et al.* y de Jong *et al.*, en los cuales se indica que la inmovilización provoca disminuciones en los diámetros de las fibras musculares (atrofia), mayor presencia de núcleos concéntricos, procesos de conversión de fibras tipo I a tipo II, sobreexpresión de colágeno y la disminución de la extensibilidad muscular [18, 106, 110, 146, 147]. Sin embargo, existe un estudio desarrollado por Clark *et al.* que sugiere que la inmovilización prolongada, en muchos casos, puede llegar a mejorar la resistencia a la fatiga [148]. Los resultados de Clark *et al.* no concuerdan con lo reportado en este trabajo y resultan algo paradójicos, teniendo en cuenta que los músculos esqueléticos inmovilizados experimentan conversiones de fibras tipo I a tipo II, por lo que sus tiempos de fatiga deberían reducirse.

Por último, los resultados recalcan la importancia de utilizar técnicas complementarias

en el estudio de los cambios musculares producidos por distintos modelos de experimentación, de esta manera se realiza un análisis integral de los efectos provocados sobre los músculos y se evita posibles malinterpretaciones. Por ejemplo, en el *rectus femoris* los registros de las fuerzas específicas son muy similares para los modelos de inmovilización y entrenamiento; esto podría llevar a la conclusión de que los efectos de los dos modelos experimentales sobre el músculo son equivalentes, algo que es desmentido mediante el análisis de las tinciones histológicas e histoquímicas. No obstante, a pesar de que en este trabajo se estudia los cambios morfológicos y funcionales de los músculos de una forma muy completa, también pueden encontrarse ciertas limitaciones en los resultados. La principal limitación es la cantidad de animales que fueron empleados en cada grupo, si bien existen estudios preclínicos en los que se ha usado un número similar de especímenes por grupo ($n = 5 - 11$) [27, 32, 70], sería recomendable aumentar la cantidad de murinos para cada modelo, de tal manera que los indicadores morfológicos, histoquímicos y funcionales obtenidos tengan mayor peso estadístico y se reduzca el porcentaje de puntos atípicos. Este estudio tampoco analiza la expresión de proteínas y enzimas involucradas en las adaptaciones celulares de las fibras musculares; sería interesante complementar aún más el estudio mediante la inclusión de técnicas que permitan evaluar los mecanismos celulares específicos mediante los cuales los músculos esqueléticos reaccionan a los modelos de inmovilización y entrenamiento. Entre las técnicas complementarias que se pueden aplicar se encuentran el *western blot*, la PCR cuantitativa, los *immunoblots*, entre otras. A pesar de las limitaciones, se considera que los resultados presentados son suficientes para describir las adaptaciones musculares frente a condiciones de inmovilización y HIIT de resistencia, tanto para músculos rápidos como para músculos lentos.

Capítulo 5

Conclusiones

En este estudio se logró determinar los cambios morfológicos, histoquímicos y mio-mecánicos en los músculos esqueléticos de ratones hembra sometidas a modelos de inmovilización y entrenamiento de resistencia HIIT. Los cambios morfológicos fueron estudiados mediante tinciones H&E y tricromía de Masson, mientras que las alteraciones histoquímicas fueron determinadas empleando tinciones NADH-TR. Las propiedades mecánicas de los músculos se evaluaron mediante los registros de las fuerzas de contracción obtenidas a diferentes frecuencias de estimulación. Adicionalmente, se midieron los pesos corporales y los parámetros morfométricos de las extremidades posteriores de los especímenes.

Se implementó un modelo de entrenamiento de resistencia a intervalos de alta intensidad modificado del protocolo HIIT de Seldeen *et al.* [27]. Los resultados comprobaron que el entrenamiento desarrollado estimula la resistencia a la fatiga en los músculos esqueléticos y no la hipertrofia muscular. Esto fue verificado con la reducción de los diámetros y perímetros del muslo y la pantorrilla en los especímenes entrenados, la reducción de las fuerzas específicas en músculos rápidos, el aumento de las fuerzas específicas en músculos lentos, la disminución de la susceptibilidad a la fatiga muscular y la reducción de los diámetros de las fibras musculares. Con el modelo de inmovilización se verificó la producción de atrofia en los músculos esqueléticos, caracterizada por la disminución de los pesos y las secciones transversales musculares, la reducción en el diámetro de las fibras y la conversión de fibras de tipo I a tipo II en los músculos lentos.

Con el HIIT de resistencia tanto el músculo RF como el SOL presentaron menores diámetros de fibra, mayor cantidad de núcleos concéntricos, mayores tiempos de fatiga y

ningún cambio significativo en los porcentajes de fibras tipo I y II. En el caso del *rectus femoris* se observó una mayor presencia de colágeno respecto al control y una disminución en la fuerza de contracción, mientras que el *soleus* presentó condiciones contrarias, mostrando una menor presencia de colágeno y un incremento en sus fuerzas tetánica y específicas. Con la inmovilización, los músculos RF y SOL mostraron menores diámetros de fibra (atrofia), mayor porcentaje de núcleos concéntricos, mayor presencia de colágeno en las fibras, menor fuerza de contracción y un aumento en la susceptibilidad a la fatiga. Sin embargo, solo en el músculo *soleus* la inmovilización provocó cambios significativos en los porcentajes de fibras tipo I y II.

Tanto para el modelo de entrenamiento como para el de inmovilización la cantidad de parámetros que mostraron diferencias estadísticamente significativas fueron mayores para el músculo *soleus*. Con base a esto, se puede concluir que el músculo *soleus* es más susceptible a experimentar cambios morfológicos, histoquímicos y mio-mecánicos con los modelos de HIIT de resistencia e inmovilización. Para el caso del modelo de inmovilización, la mayor afectación del músculo *soleus* concuerda con lo reportado en otros estudios [75–77]. En cuanto al HIIT de resistencia, la mayor susceptibilidad del músculo *soleus* verifica que el protocolo diseñado afecta mayoritariamente a las fibras tipo I, por lo que los músculos lentos son más propensos a experimentar cambios morfológicos y funcionales con este tipo de entrenamiento.

Referencias

- [1] Torday JS. Homeostasis as the mechanism of evolution. *Biology (Basel)*, 4(3):573–90, 2015.
- [2] Mukund K and Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 12(1):e1462, 2020.
- [3] Liu JC, Dong SS, Shen H, Yang DY, Chen BB, Ma XY, Peng YR, Xiao HM, and Deng HW. Multi-omics research in sarcopenia: Current progress and future prospects. *Ageing Res Rev*, 76:101576, 2022.
- [4] Masschelein E, D’Hulst G, Zvick J, Hinte L, Soro-Arnaiz I, Gorski T, von Meyenn F, Bar-Nur O, and De Bock K. Exercise promotes satellite cell contribution to myofibers in a load-dependent manner. *Skelet Muscle*, 10(1):21, 2020.
- [5] Morton R, Murphy K, McKellar S, Schoenfeld B, Henselmans M, Helms E, Aragon AA, Devries MC, Banfield L, Krieger JW, and Phillips SM. A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. *Br J Sports Med*, 52(6):376–384, 2018.
- [6] Ng R, Banks GB, Hall JK, Muir LA, Ramos JN, Wicki J, Odom GL, Konieczny P, Seto J, Chamberlain JR, and Chamberlain JS. Animal models of muscular dystrophy. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 105:83–111, 2012.
- [7] Brust V, Schindler PM, and Lewejohann L. Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). *Front Zool*, 12(Suppl 1):S17, 2015.

- [8] Xie WQ, He M, Yu DJ, Wu YX, Wang XH, Lv S, Xiao WF, and Li YS. Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 12(3):538–554, 2021.
- [9] Goh Q, Song T, Petrany MJ, Cramer AA, Sun C, Sadayappan S, Lee SJ, and Millay DP. Myonuclear accretion is a determinant of exercise-induced remodeling in skeletal muscle. *Elife*, 8:e44876, 2019.
- [10] Liu L, Broszczak DA, Broadbent JA, Singh DP, Steck R, Parker TJ, and Peake JM. Comparative label-free mass spectrometric analysis of temporal changes in the skeletal muscle proteome after impact trauma in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 318(6):E1022–E1037, 2020.
- [11] Strakowski J and Chiou-Tan F. Musculoskeletal ultrasound for traumatic and torsional alterations. *Muscle & Nerve*, 62(6):654–663, 2020.
- [12] Paun B, Leon DG, Cabello AC, Pages RM, de la Calle Vargas E, Muñoz PC, Garcia VV, Castell-Conesa J, Baleriola MM, and Camacho JRH. Modelling the skeletal muscle injury recovery using in vivo contrast-enhanced micro-CT: a proof-of-concept study in a rat model. *Eur Radiol Exp*, 4(1):33, 2020. Erratum in: *Eur Radiol Exp*, 4(1):69, 2020.
- [13] Akhtar F and Bokhari SRA. *Apoptosis*. 2023 Apr 14. In: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 29762996.
- [14] Suh HR, Park EH, Moon SW, Kim JW, Cho HY, and Han HC. Apoptotic changes in a full-lengthened immobilization model of rat soleus muscle. *Muscle Nerve*, 59(2):263–269, 2019.
- [15] Oishi PE, Cholsiripunlert S, Gong W, Baker AJ, and Bernstein HS. Myo-mechanical analysis of isolated skeletal muscle. *J Vis Exp*, (48):2592, 2011.
- [16] Wang C, Yue F, and Kuang S. Muscle histology characterization using H&E staining and muscle fiber type classification using immunofluorescence staining. *Bio Protoc*, 7(10):e2279, 2017.
- [17] Dubowitz V, Sewry C, and Oldfors A. *Muscle Biopsy A Practical Approach*. SAUNDERS Elsevier, United Kingdom, 4th edition, 2013.

- [18] Foresto CS, Paula-Gomes S, Silveira WA, Graça FA, Kettelhut Ido C, Gonçalves DA, and Mattiello-Sverzut AC. Morphological and molecular aspects of immobilization-induced muscle atrophy in rats at different stages of postnatal development: the role of autophagy. *J Appl Physiol (1985)*, 121(3):646–60, 2016.
- [19] Mañas-García L, Penedo-Vázquez A, López-Postigo A, Deschrevel J, Durán X, and Barreiro E. Prolonged immobilization exacerbates the loss of muscle mass and function induced by cancer-associated cachexia through enhanced proteolysis in mice. *Int J Mol Sci*, 21(21):8167, 2020.
- [20] Graul AI, Stringer M, and Sorbera L. Cachexia. *Drugs Today (Barc)*, 52(9):519–529, 2016.
- [21] Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, and Fearon KCH. Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Primers*, 4:17105, 2018.
- [22] Pham VC, Anania VG, Phung QT, and Lill JR. Chapter fourteen - complementary methods for the identification of substrates of proteolysis. In Ashkenazi A, Yuan J, and Wells JA, editors, *Regulated Cell Death Part A: Apoptotic Mechanisms*, volume 544 of *Methods in Enzymology*, pages 359–380. Academic Press, 2014.
- [23] Ichimiya T, Yamakawa T, Hirano T, Yokoyama Y, Hayashi Y, Hirayama D, Waga-suma K, Itoi T, and Nakase H. Autophagy and autophagy-related diseases: A review. *Int J Mol Sci*, 21(23):8974, 2020.
- [24] Bell RA, Al-Khalaf M, and Megeney LA. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. *Skelet Muscle*, 6:16, 2016. Erratum in: *Skelet Muscle*, 6:19, 2016.
- [25] Olesen AT, Malchow-Møller L, Bendixen RD, Kjær M, Mackey AL, Magnusson SP, and Svensson RB. Intramuscular connective tissue content and mechanical properties: Influence of aging and physical activity in mice. *Exp Gerontol*, 166:111893, 2022.
- [26] Zuo Q, Wang SC, Yu XK, and Chao WW. Response of macrophages in rat skeletal muscle after eccentric exercise. *Chin J Traumatol*, 21(2):88–95, 2018.

- [27] Seldeen KL, Lasky G, Leiker MM, Pang M, Personius KE, and Troen BR. High intensity interval training improves physical performance and frailty in aged mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 73(4):429–437, 2018.
- [28] Rueda AN, Ruiz-Trejo C, López-Pineda E, Romero-Piña ME, and Medina LA. Dosimetric Evaluation in Micro-CT Studies Used in Preclinical Molecular Imaging. *Appl Sci*, 11(17):7930, 2021.
- [29] van Putten M, Lloyd EM, de Greef JC, Raz V, Willmann R, and Grounds MD. Mouse models for muscular dystrophies: an overview. *Dis Model Mech*, 13(2):dmm043562, 2020.
- [30] Mizutani R and Suzuki Y. X-ray microtomography in biology. *Micron*, 43(2-3):104–15, 2012.
- [31] Mizutani H, Takeda Y, Momose A, Takeuchi A, and Takagi T. X-ray microscopy for neural circuit reconstruction. *Journal of Physics: Conference Series*, 186:012092, 2009.
- [32] Kawanishi N, Funakoshi T, and Machida S. Time-course study of macrophage infiltration and inflammation in cast immobilization-induced atrophied muscle of mice. *Muscle Nerve*, 57(6):1006–1013, 2018.
- [33] Luciano TF, Marques SO, Pieri BL, de Souza DR, Araújo LV, Nesi RT, Scheffer DL, Comin VH, Pinho RA, Muller AP, and de Souza CT. Responses of skeletal muscle hypertrophy in wistar rats to different resistance exercise models. *Physiol Res*, 66(2):317–323, 2017.
- [34] Wood AW. *Physiology, Biophysics, and Biomedical Engineering. Series in Medical Physics and Biomedical Engineering*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton-USA, 2012.
- [35] Ji Y, Li M, Chang M, Liu R, Qiu J, Wang K, Deng C, Shen Y, Zhu J, Wang W, Xu L, and Sun H. Inflammation: Roles in skeletal muscle atrophy. *Antioxidants (Basel)*, 11(9):1686, 2022.
- [36] Frontera WR and Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96(3):183–195, 2015.

-
- [37] Stacchiotti A, Favero G, and Rodella L. Impact of melatonin on skeletal muscle and exercise. *Cells*, 9(2):288, 2020.
- [38] Giudice J and Taylor JM. Muscle as a paracrine and endocrine organ. *Curr Opin Pharmacol*, 34:49–55, 2017.
- [39] Iberite F, Gruppioni E, and Ricotti L. Skeletal muscle differentiation of human iPSCs meets bioengineering strategies: perspectives and challenges. *NPJ Regen Med*, 7(1):23, 2022.
- [40] Yin L, Li N, Jia W, Wang N, Liang M, Yang X, and Du G. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacol Res*, 172:105807, 2021.
- [41] Wang W, Li M, Chen Z, Xu L, Chang M, Wang K, Deng C, Gu Y, Zhou S, Shen Y, Tao F, and Sun H. Biogenesis and function of extracellular vesicles in pathophysiological processes of skeletal muscle atrophy. *Biochem Pharmacol*, 198:114954, 2022.
- [42] Zatsiorsky VM and Prilutsky BI. *Biomechanics of Skeletal Muscles*. Human Kinetics, Champaign, IL, USA, 2012.
- [43] Sjöström M, Lexell J, and Downham DY. Differences in fiber number and fiber type proportion within fascicles. A quantitative morphological study of whole vastus lateralis muscle from childhood to old age. *Anat Rec*, 234(2):183–9, 1992.
- [44] Baán JA, Kocsis T, Keller-Pintér A, Müller G, Zádor E, Dux L, and Mendler L. The compact mutation of myostatin causes a glycolytic shift in the phenotype of fast skeletal muscles. *J Histochem Cytochem*, 61(12):889–900, 2013.
- [45] Muscolino JE. *The Muscular System Manual The Skeletal Muscles of the Human Body*. Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 4th edition, 2016.
- [46] Banay GL. An introduction to medical terminology I. Greek and Latin derivations. *Bull Med Libr Assoc*, 36(1):1–27, 1948.
- [47] Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. W B Saunders, London, England, 12th edition, 2011.
- [48] Lieber RL. *Skeletal Muscle Structure, Function, and Plasticity The Physiological Basis of Rehabilitation*. Wolters Kluwer Health Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 3rd edition, 2011.

- [49] Roman W and Gomes ER. Nuclear positioning in skeletal muscle. *Semin Cell Dev Biol*, 82:51–56, 2018.
- [50] Al-Qusairi L and Laporte J. T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skeletal Muscle*, 1(1):26, 2011.
- [51] Jones D, Round J, and de Haan A. *Skeletal muscle From Molecules to Movement. A Textbook of Muscle Physiology for Sport, Exercise, Physiotherapy and Medicine*. Churchill Livingstone Elsevier, London, United Kingdom, 2004.
- [52] Punkt K. *Fibre Types in Skeletal Muscles (Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology)*, volume 162. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 2002.
- [53] Hardin J, Bertoni G, and Kleinsmith LJ. *Becker's World of the Cell*. Pearson Benjamin Cummings. Pearson Publishing, San Francisco, CA, USA, 10th edition, 2022.
- [54] Wu H, Xiong WC, and Mei L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development*, 137(7):1017–33, 2010.
- [55] Lavdas AA, Matsas R, and Larry RS. *Schwann Cell Morphology*. Encyclopedia of Neuroscience. Oxford: Academic Press, 2009.
- [56] Cherry JR. Directed evolution of microbial oxidative enzymes. *Curr Opin Biotechnol*, 11(3):250–4, 2000.
- [57] Wegener M and Dietz KJ. The mutual interaction of glycolytic enzymes and RNA in post-transcriptional regulation. *RNA*, 28(11):1446–1468, 2022.
- [58] Luo X, Zhang H, Cao X, Yang D, Yan Y, Lu J, Wang X, and Wang H. Endurance exercise-induced Fgf21 promotes skeletal muscle fiber conversion through TGF- β 1 and p38 MAPK signaling pathway. *Int J Mol Sci*, 24(14):11401, 2023.
- [59] Lee SH, Kim BJ, Park DR, and Kim UH. Exercise induces muscle fiber type switching via transient receptor potential melastatin 2-dependent Ca²⁺ signaling. *J Appl Physiol (1985)*, 124(2):364–373, 2018.
- [60] Plotkin DL, Roberts MD, Haun CT, and Schoenfeld BJ. Muscle fiber type transitions with exercise training: Shifting perspectives. *Sports (Basel)*, 9(9):127, 2021.

- [61] Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, and Staron RS. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol*, 88(1-2):50–60, 2002.
- [62] Röckl KS, Hirshman MF, Brandauer J, Fujii N, Witters LA, and Goodyear LJ. Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. *Diabetes*, 56(8):2062–9, 2007.
- [63] Torma F, Gombos Z, Jokai M, Takeda M, Mimura T, and Radak Z. High intensity interval training and molecular adaptive response of skeletal muscle. *Sports Med Health Sci*, 1(1):24–32, 2019.
- [64] Yamada T, Kimura I, Ashida Y, Tamai K, Fusagawa H, Tohse N, Westerblad H, Andersson DC, and Sato T. Larger improvements in fatigue resistance and mitochondrial function with high- than with low-intensity contractions during interval training of mouse skeletal muscle. *FASEB J*, 35(11):e21988, 2021.
- [65] Yamada T, Ashida Y, Tamai K, Kimura I, Yamauchi N, Naito A, Tokuda N, Westerblad H, Andersson DC, and Himori K. Improved skeletal muscle fatigue resistance in experimental autoimmune myositis mice following high-intensity interval training. *Arthritis Res Ther*, 24(1):156, 2022.
- [66] Krstrup P, Söderlund K, Mohr M, González-Alonso J, and Bangsbo J. Recruitment of fibre types and quadriceps muscle portions during repeated, intense knee-extensor exercise in humans. *Pfugers Arch*, 449(1):56–65, 2004.
- [67] Edgett BA, Foster WS, Hankinson PB, Simpson CA, Little JP, Graham RB, and Gurd BJ. Dissociation of increases in $pgc-1\alpha$ and its regulators from exercise intensity and muscle activation following acute exercise. *PLoS ONE*, 8(8):e71623, 2013.
- [68] Folland JP and Williams AG. The adaptations to strength training: morphological and neurological contributions to increased strength. *Sports Med*, 37(2):145–68, 2007.
- [69] Luo L, Liu M, Xie H, Fan Y, Zhang J, Liu L, Li Y, Zhang Q, Wu J, Jiang C, and Wu Y. High-intensity interval training improves physical function, prevents muscle loss, and modulates macrophage-mediated inflammation in skeletal muscle of cerebral ischemic mice. *Mediators Inflamm*, 2021:1849428, 2021.

- [70] Takahashi K, Kitaoka Y, and Hatta H. Effects of endurance training on metabolic enzyme activity and transporter protein levels in the skeletal muscles of orchietomized mice. *J Physiol Sci*, 72(1):14, 2022.
- [71] Popov LD. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med*, 24(9):4892–4899, 2020.
- [72] Haberecht-Müller S, Krüger E, and Fielitz J. Out of control: The role of the ubiquitin proteasome system in skeletal muscle during inflammation. *Biomolecules*, 11(9):1327, 2021.
- [73] Dolly A, Dumas JF, and Servais S. Cancer cachexia and skeletal muscle atrophy in clinical studies: what do we really know? *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 11(6):1413–1428, 2020.
- [74] Madaro L, Passafaro M, Sala D, Etxaniz U, Lugarini F, Proietti D, Alfonsi MV, Nicoletti C, Gatto S, De Bardi M, Rojas-García R, Giordani L, Marinelli S, Pagliarini V, Sette C, Sacco A, and Puri PL. Denervation-activated STAT3-IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat Cell Biol*, 20(8):917–927, 2018.
- [75] Cho SH, Kim JH, and Song W. In vivo rodent models of skeletal muscle adaptation to decreased use. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 31(1):31–7, 2016.
- [76] Vikne H, Strøm V, Pripp AH, and Gjøvaag T. Human skeletal muscle fiber type percentage and area after reduced muscle use: A systematic review and meta-analysis. *Scand J Med Sci Sports*, 30(8):1298–1317, 2020.
- [77] Shenkman BS. From Slow to Fast: Hypogravity-Induced Remodeling of Muscle Fiber Myosin Phenotype. *Acta Naturae*, 8(4):47–59, 2016.
- [78] Costelli P, Reffo P, Penna F, Autelli R, Bonelli G, and Baccino FM. Ca(2+)-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(10):2134–46, 2005.
- [79] Lecker SH, Goldberg AL, and Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*, 17(7):1807–19, 2006.

- [80] Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(10):2121–9, 2013.
- [81] Shen Y, Zhang R, Xu L, Wan Q, Zhu J, Gu J, Huang Z, Ma W, Shen M, Ding F, and Sun H. Microarray analysis of gene expression provides new insights into denervation-induced skeletal muscle atrophy. *Front Physiol*, 10:1298, 2019.
- [82] Chen Z, Chen X, Ji Y, Zhang L, Wang W, Shen Y, and Sun H. A narrative review of the role of m6a in oxidative stress and inflammation. *Biotarget*, 5, 2021.
- [83] Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trenz F, and Grenier G. A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol (1985)*, 106(6):2049–2059, 2009.
- [84] Meyer A. Homology and homoplasmy: the retention of genetic programmes. *Novartis Found Symp*, 222:141–53; discussion 153–7, 1999.
- [85] Roth TL and Marson A. Genetic disease and therapy. *Annu Rev Pathol*, 16:145–166, 2021.
- [86] Posey JE, Harel T, Liu P, Rosenfeld JA, James RA, Coban Akdemir ZH, Walkiewicz M, Bi W, Xiao R, Ding Y, Xia F, Beaudet AL, Muzny DM, Gibbs RA, Boerwinkle E, Eng CM, Sutton VR, Shaw CA, Plon SE, Yang Y, and Lupski JR. Resolution of disease phenotypes resulting from multilocus genomic variation. *N Engl J Med*, 376(1):21–31, 2017.
- [87] Kurtz D and Travlos G. *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton USA, 3rd edition, 2018.
- [88] Paigen K. One hundred years of mouse genetics: an intellectual history. II. The molecular revolution (1981-2002). *Genetics*, 163(4):1227–35, 2003.
- [89] Mitchell SJ, Madrigal-Matute J, Scheibye-Knudsen M, Fang E, Aon M, González-Reyes JA, Cortassa S, Kaushik S, Gonzalez-Freire M, Patel B, Wahl D, Ali A, Calvo-Rubio M, Burón MI, Guitierrez V, Ward TM, Palacios HH, Cai H, Frederick DW, Hine C, Broeskamp F, Habering L, Dawson J, Beasley TM, Wan J, Ikeno Y, Hubbard G, Becker KG, Zhang Y, Bohr VA, Longo DL, Navas P, Ferrucci L, Sinclair DA, Cohen P, Egan JM, Mitchell JR, Baur JA, Allison DB, Anson RM, Villalba

- JM, Madeo F, Cuervo AM, Pearson KJ, Ingram DK, Bernier M, and de Cabo R. Effects of sex, strain, and energy intake on hallmarks of aging in mice. *Cell Metab*, 23(6):1093–1112, 2016.
- [90] Acosta-Rodríguez V, Rijo-Ferreira F, Izumo M, Xu P, Wight-Carter M, Green CB, and Takahashi JS. Circadian alignment of early onset caloric restriction promotes longevity in male C57BL/6J mice. *Science*, 376(6598):1192–1202, 2022.
- [91] Cao F, Ralph MR, and Stinchcombe AR. A phenomenological mouse circadian pacemaker model. *J Biol Rhythms*, 37(3):329–342, 2022.
- [92] Treuting P, Dintzis S, and Montine K. *Comparative anatomy and histology : a mouse, rat, and human atlas*. Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 2nd edition, 2018.
- [93] Mathewson MA, Chapman MA, Hentzen ER, Fridén J, and Lieber RL. Anatomical, architectural, and biochemical diversity of the murine forelimb muscles. *J Anat*, 221(5):443–51, 2012.
- [94] Schiaffino S and Reggiani C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews*, 91(4):1447–1531, 2011.
- [95] Charles JP, Cappellari O, Spence AJ, Hutchinson JR, and Wells DJ. Musculoskeletal geometry, muscle architecture and functional specialisations of the mouse hindlimb. *PLoS One*, 11(4):e0147669, 2016.
- [96] Moore TY, Rivera AM, and Biewener AA. Vertical leaping mechanics of the Lesser Egyptian Jerboa reveal specialization for maneuverability rather than elastic energy storage. *Front Zool*, 14:32, 2017.
- [97] Murdock CJ, Mudreac A, and Agyeman K. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Rectus Femoris Muscle*. 2022 Nov 4. In: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 30969719.
- [98] Mänttari S and Järvilehto M. Comparative analysis of mouse skeletal muscle fibre type composition and contractile responses to calcium channel blocker. *BMC Physiol*, 5(1):4, 2005.
- [99] Bordoni B and Varacallo M. *Anatomy, Bony Pelvis and Lower Limb, Gastrocnemius Muscle*. 2023 Apr 17. In: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 30422541.

- [100] Binstead JT, Munjal A, and Varacallo M. *Anatomy, Bony Pelvis and Lower Limb: Calf*. 2023 May 23. In: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 29083629.
- [101] Larson L, Liroy J, Johnson J, and Medler S. Transitional hybrid skeletal muscle fibers in rat soleus development. *J Histochem Cytochem*, 67(12):891–900, 2019.
- [102] Totsuka Y, Nagao Y, Horii T, Yonekawa H, Imai H, Hatta H, Izaike Y, Tokunaga T, and Atomi Y. Physical performance and soleus muscle fiber composition in wild-derived and laboratory inbred mouse strains. *Journal of Applied Physiology*, 95(2):720–727, 2003.
- [103] Soukup T, Zacharová G, and Smerdu V. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem*, 104(4):399–405, 2002.
- [104] Suvarna SK, Layton C, and Bancroft JD. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone Elsevier, United Kingdom, 7th edition, 2013.
- [105] Buratti P, Covatti C, Centenaro LA, Brancalhão RMC, and Torrejais MM. Morphofunctional characteristics of skeletal muscle in rats with cerebral palsy. *Int J Exp Pathol*, 100(1):49–59, 2019.
- [106] Venojärvi M, Kvist M, Jozsa L, Kalimo H, Hänninen O, and Atalay M. Skeletal muscle HSP expression in response to immobilization and remobilization. *Int J Sports Med*, 28(4):281–6, 2007.
- [107] Pollock-Tahiri E and Locke M. The cellular stress response of rat skeletal muscle following lengthening contractions. *Appl Physiol Nutr Metab*, 42(7):708–715, 2017.
- [108] Van De Vlekkert D, Machado E, and d’Azzo A. Analysis of generalized fibrosis in mouse tissue sections with Masson’s Trichrome staining. *Bio Protoc*, 10(10):e3629, 2020.
- [109] García-Pelagio KP, Chen L, Joca HC, Ward C, Lederer W, and Bloch RJ. Absence of synemin in mice causes structural and functional abnormalities in heart. *J Mol Cell Cardiol*, 114:354–363, 2018.

- [110] Honda Y, Tanaka M, Tanaka N, Sasabe R, Goto K, Kataoka H, Sakamoto J, Nakano J, and Okita M. Relationship between extensibility and collagen expression in immobilized rat skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 57(4):672–678, 2018.
- [111] Tinklenberg J, Beatka M, Bain JLW, Siebers EM, Meng H, Pearsall RS, Lawlor MW, and Riley DA. Use of ankle immobilization in evaluating treatments to promote longitudinal muscle growth in mice. *Muscle Nerve*, 58(5):718–725, 2018.
- [112] Onda A, Kono H, Jiao Q, Akimoto T, Miyamoto T, Sawada Y, Suzuki K, Kusakari Y, Minamisawa S, and Fukubayashi T. New mouse model of skeletal muscle atrophy using spiral wire immobilization. *Muscle Nerve*, 54(4):788–91, 2016.
- [113] Aihara M, Hirose N, Katsuta W, Saito F, Maruyama H, and Hagiwara H. A new model of skeletal muscle atrophy induced by immobilization using a hook-and-loop fastener in mice. *J Phys Ther Sci*, 29(10):1779–1783, 2017.
- [114] Oishi PE, Cholsiripunlert S, Gong W, Baker AJ, and Bernstein HS. Myo-mechanical analysis of isolated skeletal muscle. *J Vis Exp*, 1(48):2582, 2017.
- [115] Macefield VG, Fuglevand AJ, and Bigland-Ritchie B. Contractile properties of single motor units in human toe extensors assessed by intraneural motor axon stimulation. *Development*, 75(6):2509–19, 1996.
- [116] du Plessis A, Broeckhoven C, Guelpa A, and le Roux SG. Laboratory x-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples. *Gigascience*, 6(6):1–11, 2017.
- [117] Anwar M, Mallick S, Paliwal D, Shekhar S, Panda SK, Dey S, and Dey AB. Impact of physical activity on mitochondrial enzymes, muscle stem cell and anti-oxidant protein Sestrins in Sarcopenic mice. *Exp Gerontol*, 150:111358, 2021.
- [118] Schneider CA, Rasband WS, and Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7):671–675, 2012.
- [119] Rukhin AL. Weighted means statistics in interlaboratory studies. *Metrologia*, 46(3):323, 2009.
- [120] Lee S and Lee DK. What is the proper way to apply the multiple comparison test? *Korean J Anesthesiol*, 71(5):353–360, 2018.

- [121] Contreras-Muñoz P, Fernández-Martín A, Torrella R, Serres X, De la Varga M, Viscor G, Järvinen TA, Martínez-Ibáñez V, Peiró JL, Rodas G, and Marotta M. A new surgical model of skeletal muscle injuries in rats reproduces human sports lesions. *Int J Sports Med*, 37(3):183–90, 2016.
- [122] Wall BT, Morton JP, and van Loon LJ. Strategies to maintain skeletal muscle mass in the injured athlete: nutritional considerations and exercise mimetics. *Eur J Sport Sci*, 15(1):53–62, 2015.
- [123] Suchomel TJ, Nimphius S, Bellon CR, and Stone MH. The importance of muscular strength: Training considerations. *Sports Med*, 48(4):765–785, 2018.
- [124] Hostrup M, Lemming AK, Stocks B, Gonzalez-Franquesa A, Larsen JK, Quesada JP, Thomassen M, Weinert BT, Bangsbo J, and Deshmukh AS. High-intensity interval training remodels the proteome and acetylome of human skeletal muscle. *Elife*, 11:e69802, 2022.
- [125] Luo D, Edwards S, Smeuninx B, McKendry J, Nishimura Y, Perkins M, Philp A, Joannis S, and Breen L. Immobilization leads to alterations in intracellular phosphagen and creatine transporter content in human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. Epub ahead of print, 2020.
- [126] Baumann CW, Kwak D, and Thompson LV. Sex-specific components of frailty in C57BL/6 mice. *Aging (Albany NY)*, 11(14):5206–5214, 2019.
- [127] Shin JA, Kim HS, Lee Kang J, and Park EM. Estrogen deficiency is associated with brain iron deposition via upregulation of hepcidin expression in aged female mice. *Neurobiol Aging*, 96(1):33–42, 2020.
- [128] Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*, Appendix 4:Appendix 4I, 2009.
- [129] Englund DA, Peck BD, Murach KA and Neal AC, Caldwell HA, McCarthy JJ, Peterson CA, and Dupont-Versteegden EE. Resident muscle stem cells are not required for testosterone-induced skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 317(4):C719–C724, 2019.

- [130] Lesnak JB, Inoue S, Lima L, Rasmussen L, and Sluka KA. Testosterone protects against the development of widespread muscle pain in mice. *Pain*, 161(12):2898–2908, 2020.
- [131] Seldeen KL, Redae YZ, Thiyagarajan R, Berman RN, Leiker MM, and Troen BR. High intensity interval training improves physical performance in aged female mice: A comparison of mouse frailty assessment tools. *Mech Ageing Dev*, 180:49–62, 2019.
- [132] Motta VF, Bargut TL, Aguila MB, and Mandarim-de-Lacerda CA. Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 123(4):699–709, 2017.
- [133] Henríquez-Olguín C, Renani LB, Arab-Ceschia L, Raun SH, Bhatia A, Li Z, Knudsen JR, Holmdahl R, and Jensen TE. Adaptations to high-intensity interval training in skeletal muscle require NADPH oxidase 2. *Redox Biol*, 24:101188, 2019.
- [134] Pimenta M, Bringhentí I, Souza-Mello V, Dos Santos Mendes IK, Aguila MB, and Mandarim-de-Lacerda CA. High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice. *Life Sci*, 139:75–82, 2015.
- [135] Wang N, Liu Y, Ma Y, and Wen D. High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. *Life Sci*, 191:122–131, 2017.
- [136] Wyganowska-Swiatkowska M, Tarnowski M, Murtagh D, Skrzypczak-Jankun E, and Jankun J. Proteolysis is the most fundamental property of malignancy and its inhibition may be used therapeutically (Review). *Int J Mol Med*, 43(1):15–25, 2019.
- [137] Chavanelle V, Boisseau N, Otero YF, Combaret L, Dardevet D, Montaurier C, Delcros G, Peltier SL, and Sirvent P. Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on glycaemic control and skeletal muscle mitochondrial function in db/db mice. *Sci Rep*, 7(1):204, 2017.
- [138] Li FH, Li T, Ai JY, Sun L, Min Z, Duan R, Zhu L, Liu YY, and Liu TC. Beneficial autophagic activities, mitochondrial function, and metabolic phenotype adaptations promoted by high-intensity interval training in a rat model. *Life Sci*, 9:571, 2018.

- [139] Krüger K, Gessner DK, Seimetz M, Banisch J, Ringseis R, Eder K, Weissmann N, and Mooren FC. Functional and muscular adaptations in an experimental model for isometric strength training in mice. *PloS one*, 8(11):e79069, 2013.
- [140] Hughes DC, Ellefsen S, and Baar K. Adaptations to endurance and strength training. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8(6):a029769, 2018.
- [141] Damal-Villivalam S, Ebert SM, Lim HW, Kim J, You D, Jung BC, Palacios HH, Tcheau T, Adams CM, and Kang S. A necessary role of DNMT3A in endurance exercise by suppressing ALDH1L1-mediated oxidative stress. *EMBO J*, 40(9):e106491, 2021.
- [142] Baati N, Mougnot N, Lemaitre M, Kirsch M, Agbulut O, Ferry A, and Vitiello D. Alteration of skeletal and cardiac muscles function in DBA/2J mdx mice background: a focus on high intensity interval training. *Intractable Rare Dis Res*, 10(4):269–275, 2021.
- [143] Cao G, Meng G, Zhu L, Zhu J, Dong N, Zhou X, Zhang S, and Zhang Y. Susceptibility to chronic immobilization stress-induced depressive-like behaviour in middle-aged female mice and accompanying changes in dopamine D1 and GABAA receptors in related brain regions. *Behav Brain Funct*, 17(1):2, 2021.
- [144] Tomiya S, Tamura Y, Kouzaki K, Kotani T, Wakabayashi Y, Noda M, and Nakazato K. Cast immobilization of hindlimb upregulates sarcolipin expression in atrophied skeletal muscles and increases thermogenesis in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 317(5):R649–R661, 2019.
- [145] Madaro L, Smeriglio P, Molinaro M, and Bouche M. Unilateral immobilization: a simple model of limb atrophy in mice. *Basic Appl Myol*, 18:149–153, 2008.
- [146] de Jong JCBC, Caspers MPM, Keijzer N, Worms N, Attema J, de Ruiter C, Lek S, Nieuwenhuizen AG, Keijzer J, Menke AL, Kleemann R, Verschuren L, and van den Hoek AM. Caloric restriction combined with immobilization as translational model for sarcopenia expressing key-pathways of human pathology. *Aging Dis*, 14(3):937–957, 2023.
- [147] Honda Y, Sakamoto J, Nakano J, Kataoka H, Sasabe R, Goto K, Tanaka M, Origuchi T, Yoshimura T, and Okita M. Upregulation of interleukin-1beta/transforming

growth factor-beta1 and hypoxia relate to molecular mechanisms underlying immobilization-induced muscle contracture. *Muscle Nerve*, 52(3):419–27, 2015.

- [148] Clark BC, Hoffman RL, and Russ DW. Immobilization-induced increase in fatigue resistance is not explained by changes in the muscle metaboreflex. *Muscle Nerve*, 38(5):1466–1473, 2008.

Anexo A

Pesos y parámetros morfométricos

A.1. Evolución temporal de los pesos corporales

Cambios en los pesos corporales de las ratonas C57BL/6J del grupo control durante el periodo de monitorización.

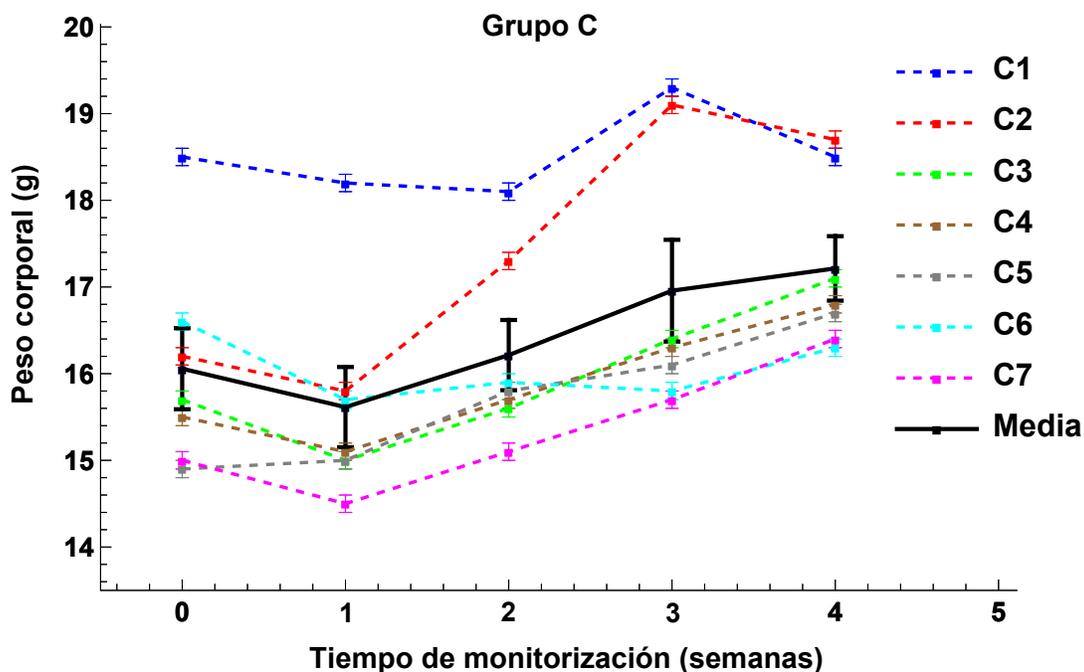


Figura A.1: Evolución temporal de los pesos corporales de las ratonas C57BL/6J del grupo control.

Cambios en los pesos corporales de las ratonas C57BL/6J de los grupos E e I durante los periodos de entrenamiento HIIT e inmovilización.

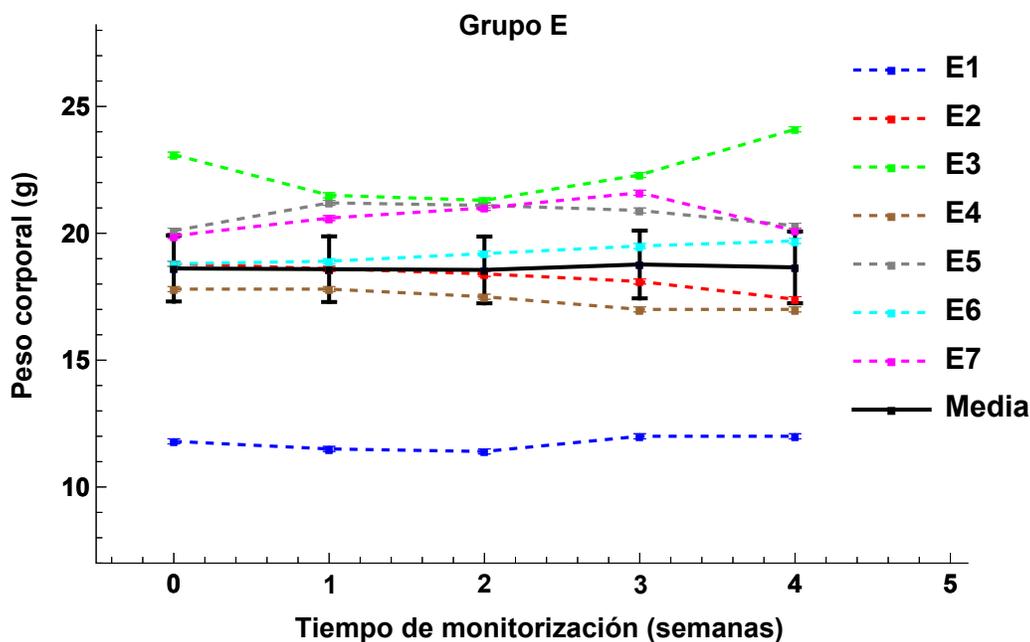


Figura A.2: Evolución temporal de los pesos corporales de las ratonas C57BL/6J del grupo de entrenamiento.

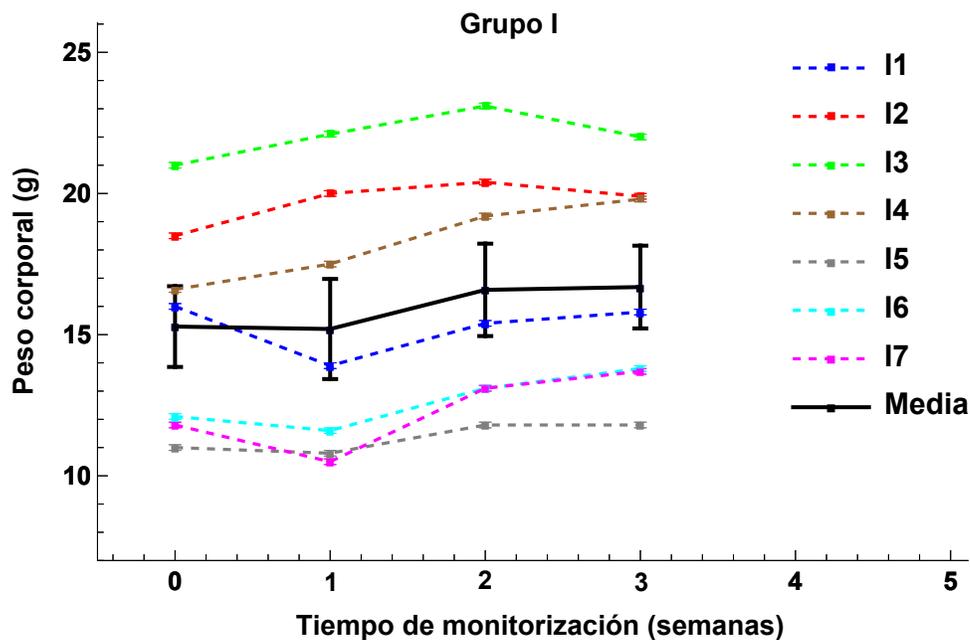


Figura A.3: Evolución temporal de los pesos corporales de las ratonas C57BL/6J del grupo de inmovilización.

A.2. Evolución de los parámetros morfométricos

Cambios en los diámetros y perímetros del muslo de las ratonas C57BL/6J del grupo control durante el periodo de monitorización.

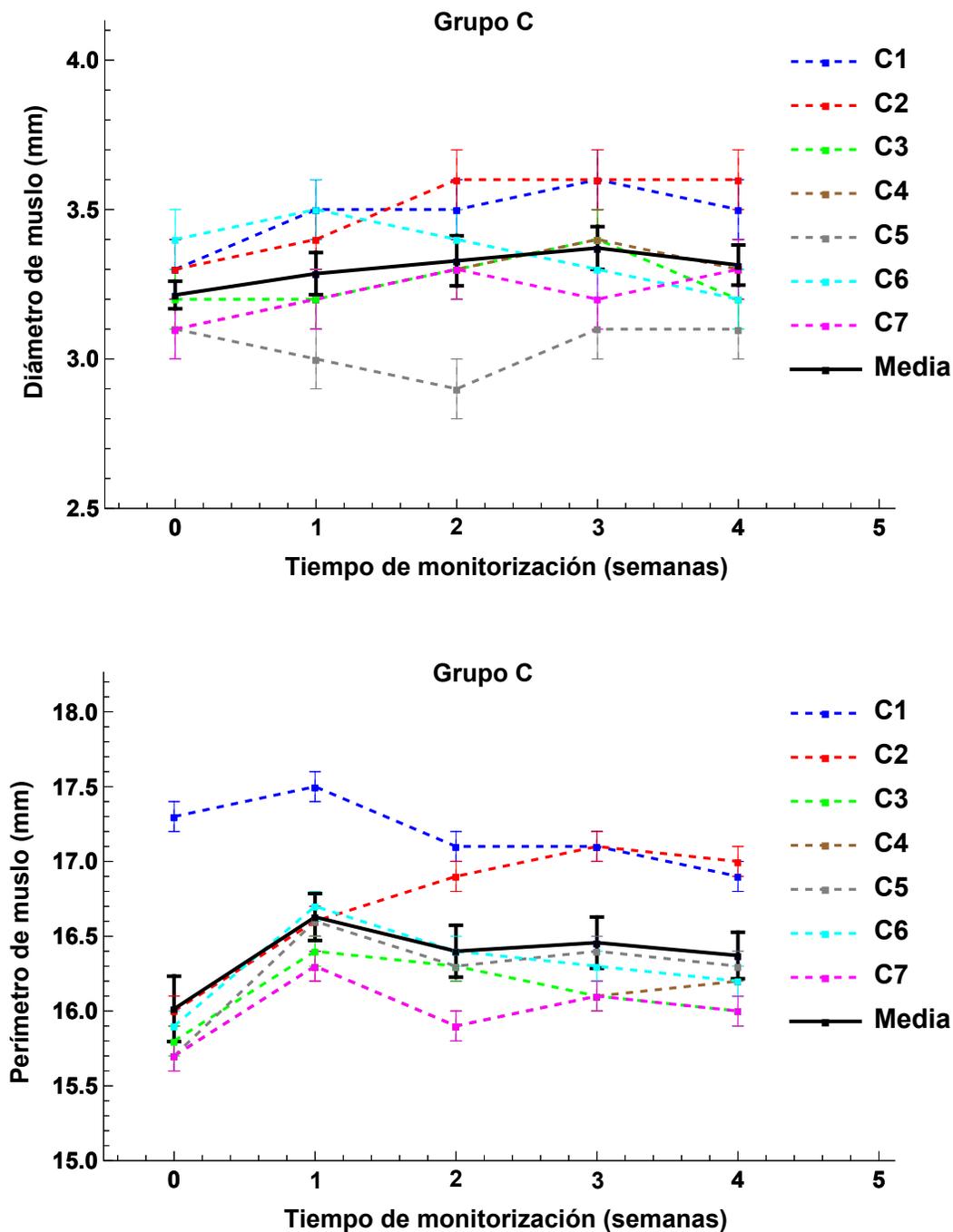


Figura A.4: Evolución temporal de los parámetros morfométricos del muslo de las ratonas C57BL/6J del grupo control: diámetros (A) y perímetros (B).

Cambios en los diámetros y perímetros de la pantorrilla de las ratonas C57BL/6J del grupo control durante el periodo de monitorización.

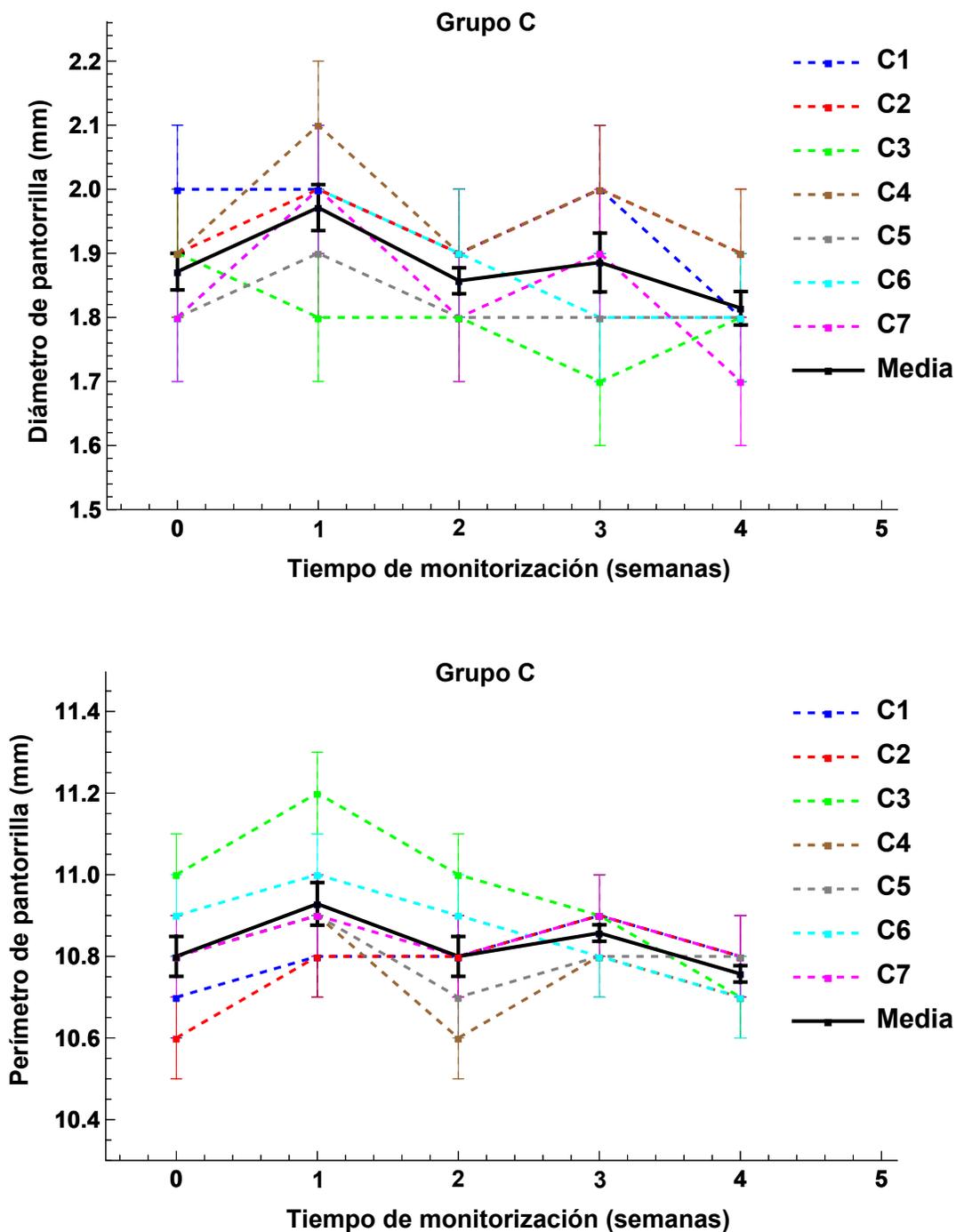


Figura A.5: Evolución temporal de los parámetros morfométricos de la pantorrilla de las ratonas C57BL/6J del grupo control: diámetros (A) y perímetros (B).

Cambios en los diámetros y perímetros del muslo de las ratonas C57BL/6J del grupo E durante el periodo de entrenamiento.

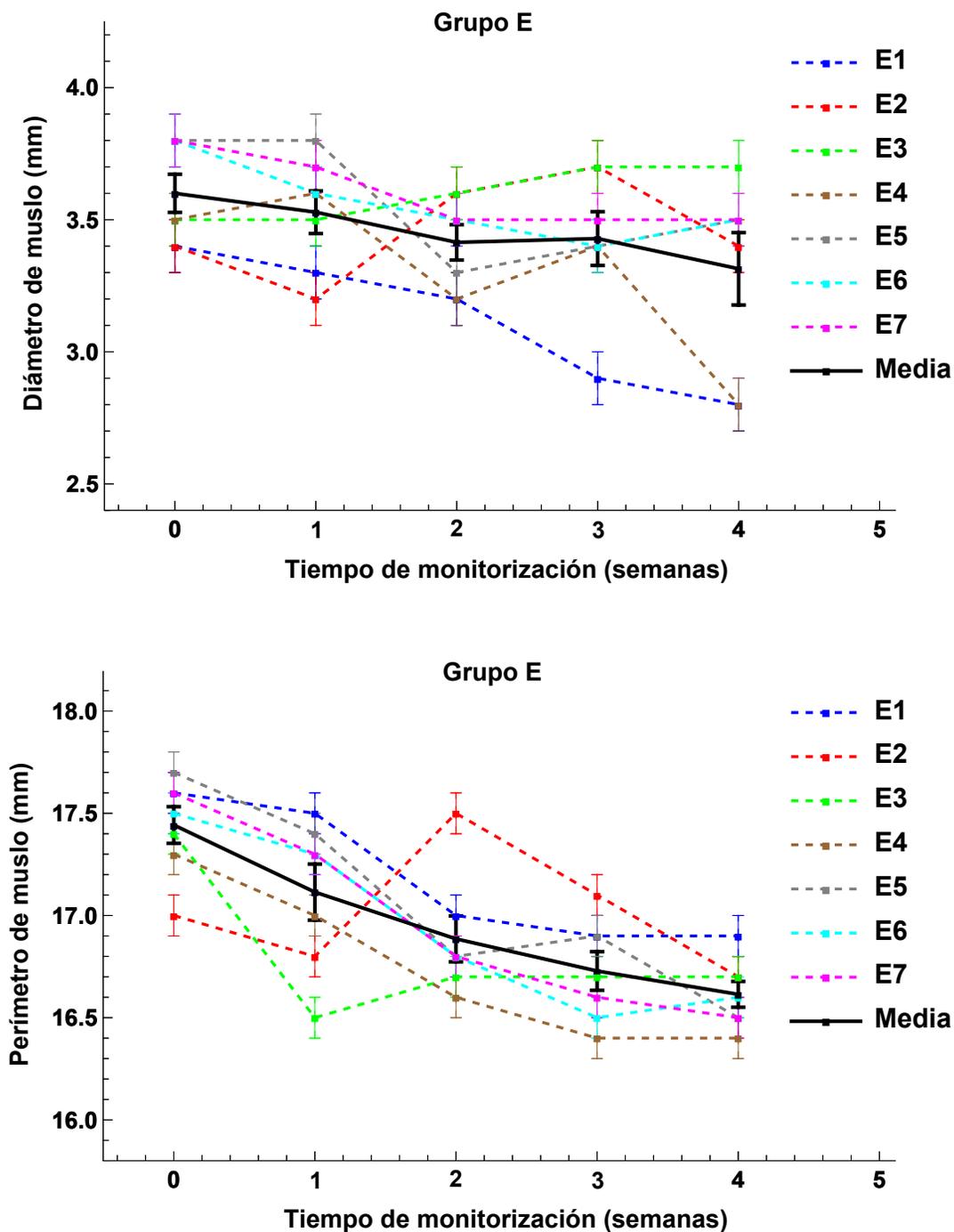


Figura A.6: Evolución temporal de los parámetros morfométricos del muslo de las ratonas C57BL/6J del grupo de entrenamiento: diámetros (A) y perímetros (B).

Cambios en los diámetros y perímetros de la pantorrilla de las ratonas C57BL/6J del grupo E durante el periodo de entrenamiento.

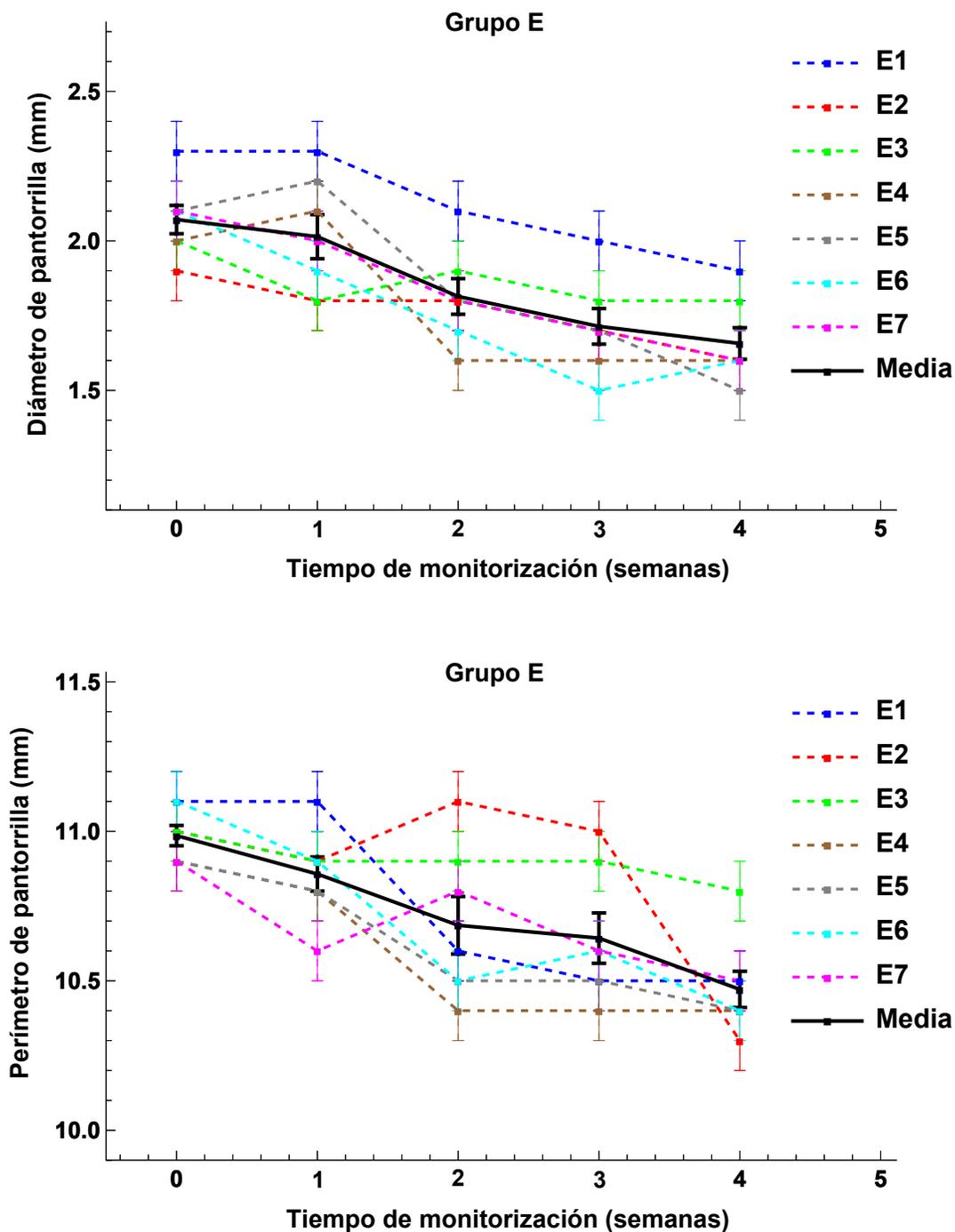


Figura A.7: Evolución temporal de los parámetros morfométricos de la pantorrilla de las ratonas C57BL/6J del grupo de entrenamiento: diámetros (A) y perímetros (B).

Cambios en los diámetros y perímetros del muslo de las ratonas C57BL/6J del grupo I durante el periodo de inmovilización.

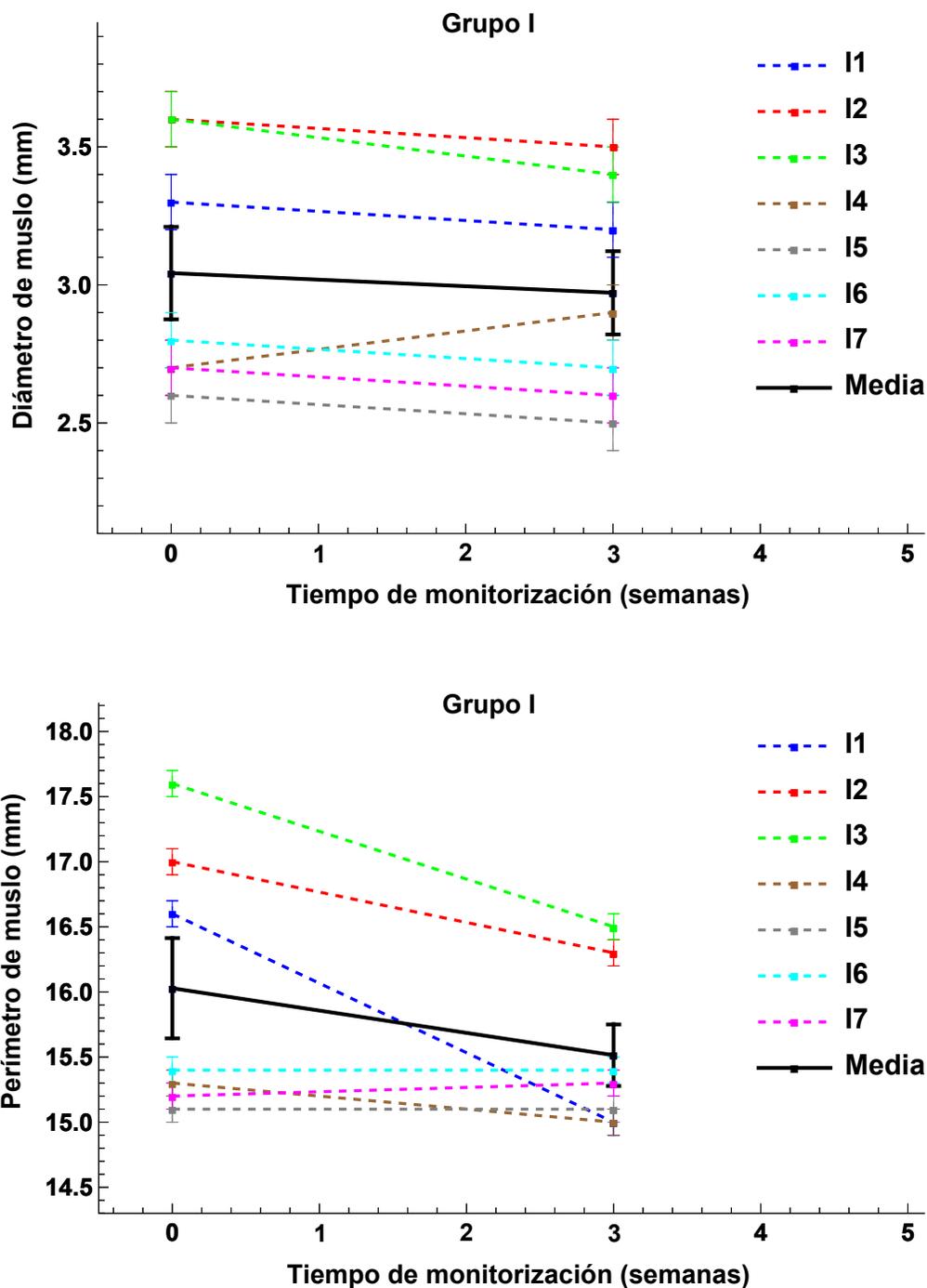


Figura A.8: Evolución temporal de los parámetros morfométricos del muslo de las ratonas C57BL/6J del grupo de inmovilización: diámetros (A) y perímetros (B).

Cambios en los diámetros y perímetros de la pantorrilla de las ratonas C57BL/6J del grupo I durante el periodo de inmovilización.

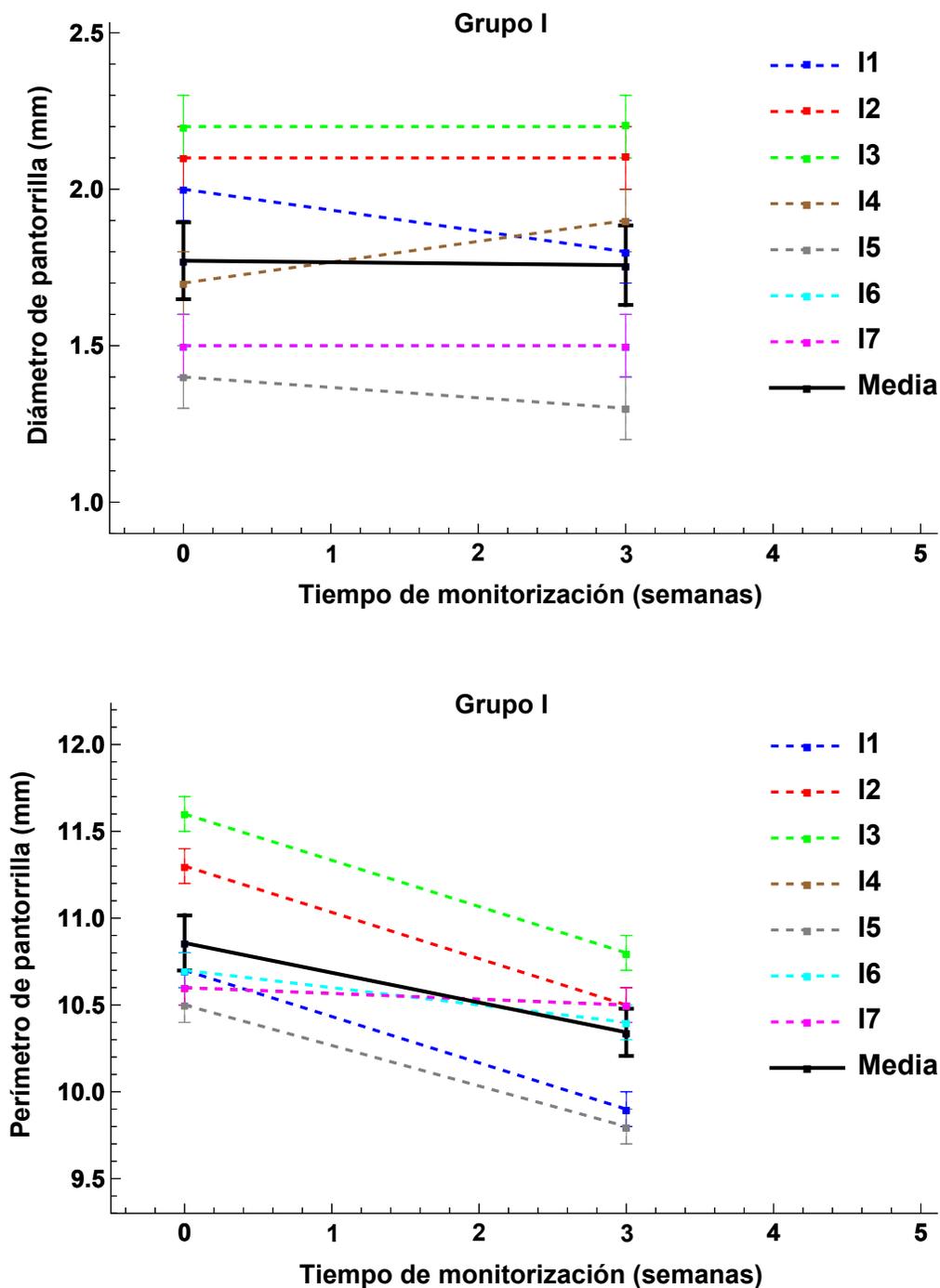


Figura A.9: Evolución temporal de los parámetros morfométricos de la pantorrilla de las ratonas C57BL/6J del grupo de inmovilización: diámetros (A) y perímetros (B).