



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EFFECTOS DE LA INMOVILIZACIÓN MUSCULAR
DE LA EXTREMIDAD POSTERIOR DERECHA
POR 7 DÍAS SOBRE LA LOCOMOCIÓN Y LAS
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E
HISTOQUÍMICAS DE LOS MÚSCULOS SÓLEO Y
EXTENSOR DIGITORUM LONGUS (EDL) DE LA
RATA HEMBRA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Fatima Guadalupe Lara Moreno

Director: Dra. Kenia López García

Co-Director: Dr. René Zempoateca Ramírez

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2021



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

EFFECTOS DE LA INMOVILIZACIÓN MUSCULAR DE LA EXTREMIDAD POSTERIOR DERECHA POR 7 DÍAS SOBRE LA LOCOMOCIÓN Y LAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS DE LOS MÚSCULOS SÓLEO Y *EXTENSOR DIGITORUM LONGUS* (EDL) DE LA RATA HEMBRA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Fatima Guadalupe Lara Moreno

Comité Tutoral

Dra. Kenia López García

Dr. René Zempoateca Ramírez

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. Ismael Jiménez Estrada

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2021

FINANCIAMIENTO

El trabajo de la presente tesis se efectuó en las instalaciones de la Universidad Popular de Tlaxcala y en el Centro de Investigación de Reproducción Animal, Unidad Periférica de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados para el Instituto Politécnico Nacional. Para su desarrollo y realización se contó con el financiamiento de la beca de CONACYT (927192, FGLM) y financiamiento al programa de SNI (63806, KLG).

La maestría en Ciencias Biológicas del Centro de Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado nacional. Padrón Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC).



Posgrado en Ciencias Biológicas
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

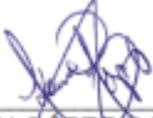
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Fatima Guadalupe Lara Moreno** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Efectos de la inmovilización muscular de la extremidad posterior derecha por 7 días sobre la locomoción y las características histológicas e histoquímicas de los músculos sóleo y *Extensor digitorum longus* (EDL) de la rata hembra”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., ENERO 25 DE 2021



DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



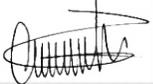
DRA. KENIA LÓPEZ GARCÍA



DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ



DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA



DR. OCTAVIO GARCÍA SÁNCHEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



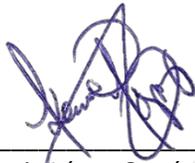
Tlaxcala, Tlax. a 27 de enero del 2021

A QUIEN CORRESPONDA,

Por medio de la presente, tras haber sometido la Tesis Final de mi estudiante **Fatima Guadalupe Lara Moreno** al programa anti-plagio comunico que esta muestra un 6% de riesgo de plagio, mismo que podría estar relacionado con la sección de metodología. Dicha metodología se ha empleado en distintos de mis trabajos y trabajos de mis estudiantes por lo que técnicamente debería ser casi idéntica. Este proceso de evaluación fue realizado conforme a las indicaciones marcadas y siguiendo el Reglamento de Bioética e Integridad Académica del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (Universidad Autónoma de Tlaxcala). El documento de la Tesis completa fue puesta a prueba en la página de acceso y uso libre: <https://my.plag.es>, una vez eliminadas las páginas de presentación que incluyen el formato institucional de las tesis del Posgrado en Ciencias Biológicas y los agradecimientos personales el porcentaje de riesgo de plagio se redujo al 5%. Se revisó en el mismo programa el parafraseo y la citas incorrectas, para los cuales se encontraron los porcentajes de 1% y 0% respectivamente.

Con los resultados anteriores, verificamos que la Tesis es el desarrollo de un trabajo original.

Saludos cordiales,



Dra. Kenia López García
Profesora de Tiempo Parcial
Universidad de las Américas Puebla

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado del Centro de Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Al apoyo recibido por la Beca CONACYT (927192, FGLM) y financiamiento al programa de SNI (63806, KLG).

A mis Co Directores de tesis, los Dres. Kenia López García y René Zempoateca Ramírez por el apoyo durante la realización del posgrado y transmisión de conocimientos.

Al comité tutorial, los Dres. Estela Cuevas Romero e Ismael Jiménez Estrada quienes formaron parte importante para la realización de este proyecto de tesis, por sus comentarios y sugerencias durante los tutorales. Especial agradecimiento al Dr. José Roberto López Ruiz (Universidad de Michigan), quien fue pieza clave en la realización de mi escrito, muchas gracias por sus comentarios, asesorías y revisiones de mi proyecto de tesis.

A IBT. Cindy Xilonen Rodríguez, M. en C. Vladimir Martínez Álvarez y el resto del equipo de laboratorio del Dr. Ismael Jiménez Estrada, quienes me recibieron y orientaron durante mis visitas al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

A los Dres. Oscar González Flores, Marcos García Juárez y Nicté Xelhuantzi Arreguín, por abrirme las puertas de sus laboratorios y poder realizar los experimentos del presente proyecto, así como su asesoramiento durante mi visita al laboratorio del CIRA y de la UPET.

A mis compañeros de laboratorio; gracias a MQB. Víctor Manuel Castillo Catillo y LQC. Guadalupe Leonel Rodríguez Alvarado por su apoyo durante los experimentos.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Estaba terminando de redactar mi tesis y empecé a preguntarme, ¿Cómo voy a redactar la hoja de agradecimientos?, ¿A quién debería agradecerle y por qué?, fue entonces cuando me di cuenta de que todo se remonta más allá a cuando estaba estudiando la maestría, que todo comenzó desde el momento en que aquel profesor “Mickey” de la secundaria sembró en mí la semillita de querer estudiar biología, seguido por todos mis profesores de la preparatoria que reafirmaron mi interés por esa rama de la ciencia.

Mi alma mater, la Universidad de las Américas Puebla, donde me forjé y encontré el área de interés de mi carrera, al Dr. Daniel Lozada y la Dra. Jessica Mundo, quienes estuvieron atentos a mi desempeño escolar y emocional durante mis estudios en la UDLAP e incluso durante la maestría.

Mis papás Armando Lara y Guadalupe Moreno, quienes siempre han estado ahí para mí apoyándome desde el momento que tomé la decisión de irme a estudiar fuera de mi ciudad natal, me han enseñado que los cambios siempre son buenos y que siempre debo luchar por mis sueños siendo un gran ejemplo para mí y mis hermanos; no alcanzarían todas las palabras del mundo para poder agradecerles.

A Victoria Lara, quien escuchaba mis pláticas por teléfono sobre la maestría y aunque no es de su área de trabajo siempre me preguntaba para saber más del tema. A Sergio Lara, quien ha estado conmigo apoyándome y motivándome todos los días para poder lograr mis sueños, además, de siempre estar al pendiente de los avances de mi trabajo.

A Ricardo Flores, quien me ha brindado su completo y total apoyo para lograr esta meta. Muchas gracias por ayudarme a ensayar más de 10 veces cuando iba a presentar los avances de mi tesis y mi examen de grado.

A Karla Lara, quien estuvo siempre al pendiente, aunque a la distancia de cómo iba con mi trabajo.

A mis buenos amigos, Alejandra Aparicio, Irma Curiel, Sandra Pérez, Ángel Martínez, Michelle Arévalo y Ximena Lozano, quienes han estado ahí para motivarme y escucharme sin importar el tiempo y la distancia.

A mis amigos de la maestría Lorena Arrollo, Isaac Martínez y Omar Montes, con quienes desde el primer día de clases hicimos un gran equipo y siempre nos apoyamos.

A mi, Fatima Lara, porqué, aunque muchas veces me preguntaba si estaba haciendo lo correcto, me seguía levantando por las mañanas y daba lo mejor de mi para poder sacar este proyecto adelante.

Y, finalmente, pero no menos importante, un especial agradecimiento a todos aquellos animales de laboratorio que son utilizados y sacrificados para poder hacer experimentos y encontrar grandes avances en la medicina. Sin ellos, nada de esto sería posible.



Estatua ubicada frente al instituto de Citología y genética de la Academia Rusa de Ciencias en Akademgorodok, Rusia. En honor a todos los animales de laboratorio que han sido sacrificados.

A. RESUMEN

El sistema músculo esquelético contribuye al desarrollo de actividades como caminar, manipular y mover objetos, entre otras. Durante el nacimiento, la adolescencia y la vejez, el sistema músculo esquelético está en constante cambio y es susceptible a presentar daños que alteren la estructura de sus fibras. Algunas causas asociadas con dichas alteraciones son: el sedentarismo, enfermedades y/o lesiones que conllevan al desuso o inmovilización de una o ambas extremidades. Durante la inmovilización, además de verse comprometida la estructura de sus fibras, se presentan alteraciones/daños en el sistema locomotor lo que depende del tiempo de desuso y/o inmovilización, el grado de lesión y los músculos involucrados. La rata (cepa Wistar) ha sido uno de los modelos animales más utilizados para evaluar los efectos de la inmovilización muscular utilizando principalmente los músculos sóleo y el extensor largo de los dedos (*Extensor digitorum longus*, EDL); estos músculos participan en el mantenimiento de la postura y la locomoción respectivamente, por lo que la constitución de sus tipos de fibras es distinta. Por un lado, el músculo sóleo en la rata está conformado principalmente por fibras lentas-oxidativas (tipo I) y; por el otro, el músculo EDL está conformado principalmente por fibras rápidas-glucolíticas (tipo IIb). Ante una lesión e inmovilización, la pérdida de movimiento en la extremidad promueve un proceso de atrofia muscular en el cual sus características histológicas y fenotípicas de sus fibras se ven comprometidas, así como su función. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue determinar los efectos de la inmovilización (7 días) de la extremidad posterior derecha en la rata hembra sobre la locomoción (ciclo, longitud, duración y velocidad de la zancada; apertura y movimiento de las articulaciones); las características histológicas (número de núcleos, área transversal de las fibras, CSA, y el dominio mionuclear, DMN) e histoquímicas (tipo y metabolismo de fibras) de los músculos sóleo y EDL de la pata ipsilateral.

Los resultados del ciclo de zancada mostraron una disminución significativa en la longitud de la zancada en el grupo inmovilizado (I) respecto al grupo control (C) 7 días después de la inmovilización (C, 9.61 ± 0.93 cm vs I, 5.18 ± 1.15 cm, $P=0.014$), así como en la velocidad de la zancada de la extremidad ipsilateral (C, 51.34 ± 10.41 cm/seg vs I, 10.52 ± 4.37 cm/seg, $P=0.009$). Los resultados para la extremidad contralateral a la inmovilización mostraron un incremento significativo en la duración (C, 0.23 ± 0.018 seg vs I, 0.394 ± 0.06

seg, $P=0.048$) y la velocidad (45.05 ± 4.93 cm/seg vs 24.37 ± 4.63 cm/seg, $P=0.012$) de la zancada. Los datos de la apertura y movimiento de las articulaciones no mostraron diferencias. Los resultados de las características histológicas e histoquímicas en el músculo sóleo mostraron una disminución significativa en el CSA y DMN después de la inmovilización (CSA; C, $482.4\pm 15.03\mu\text{m}^2$ vs I, $399.8\pm 7.9\mu\text{m}^2$, $P=0.046$, y DMN; C, 176.4 ± 12.61 vs I, 111.05 ± 1.15 , $P=0.0064$). La histoquímica para NADH-TR mostró que el músculo Sóleo es un músculo con alta actividad oxidativa, lo que concuerda con la histoquímica ATPasa básica pH 9.4, con la que se observó que está conformado por fibras tipo I (fibras lentas). Siete días después de la inmovilización, no se presentaron cambios fenotípicos en las fibras de este músculo. En el músculo EDL no se encontraron diferencias en las características histológicas después de la inmovilización. La histoquímica NADH-TR mostró que es un músculo con actividad metabólica oxidativa-glucolítica, lo que concuerda con la información obtenida de la histoquímica ATPasa básica pH 9.4 donde se observó que el músculo EDL está conformado principalmente por fibras tipo IIb y tipo IIa/IIc.

Los resultados mostraron alteraciones en los parámetros que componen la locomoción y el ciclo de zancada en la rata hembra. Dichos resultados se acompañan de cambios histológicos más marcados en el músculo sóleo que en el EDL, lo que marca el inicio de un proceso de atrofia muscular dependiente del tipo de fibra. Con esta información podemos concluir que los efectos de la inmovilización son dependientes del fenotipo muscular, lo que debería tomarse en cuenta para el tratamiento y recuperación de estos después de una lesión que comprometa su estructura y su fisiología.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	<i>Músculo esquelético</i>	1
1.2.	<i>Contracción muscular</i>	2
1.3.	<i>Clasificación de las fibras musculares</i>	4
1.4.	<i>Locomoción: Patrones de movimiento y centros generadores de patrón</i>	6
1.5.	<i>Músculo sóleo</i>	9
1.6.	<i>Músculo Extensor digitorum longus (EDL)</i>	11
2.	ANTECEDENTES	13
2.1.	<i>Alteraciones en el sistema locomotor</i>	13
2.2.	<i>Alteraciones en el sistema músculo esquelético</i>	14
2.2.1.	<i>Alteraciones musculares por inmovilización</i>	19
3.	JUSTIFICACIÓN	22
4.	HIPÓTESIS	23
5.	OBJETIVOS	24
5.1.	<i>Objetivo general</i>	24
5.2.	<i>Objetivos particulares</i>	24
6.	METODOLOGÍA	25
6.1.	<i>Animales</i>	25
6.2.	<i>Protocolo de inmovilización de la extremidad posterior derecha</i>	25
6.3.	<i>Citología vaginal</i>	26
6.4.	<i>Análisis de la locomoción</i>	26
6.4.1.	<i>Análisis de ángulos máximos (extensión) y mínimos (flexión) de las Articulaciones en el ciclo de zancada y desplazamiento angular</i>	28
6.4.2.	<i>Cálculo de longitud, duración y velocidad del ciclo de zancada</i>	29
6.5.	<i>Disección, fijación e inclusión de los músculos sóleo y Extensor digitorum longus (EDL)</i>	30
6.6.	<i>Análisis histológico del músculo sóleo y Extensor digitorum longus (EDL) con la tinción de H-E</i>	30

6.7.	<i>Características histoquímicas del músculo sóleo y Extensor digitorum longus (EDL)</i>	31
6.7.1.	<i>Determinación metabólica de fibras mediante la histoquímica NADH-TR</i>	31
6.7.2.	<i>Determinación del fenotipo de las fibras mediante la histoquímica ATPasa básica pH 9.4</i>	32
6.8.	<i>Análisis de datos</i>	33
7.	RESULTADOS	34
7.1.	<i>Parámetros morfométricos</i>	34
7.2.	<i>Citología vaginal</i>	34
7.3.	<i>Análisis de la locomoción</i>	35
7.3.1.	<i>Análisis de los ángulos máximos (extensión) y mínimos (flexión) de las articulaciones en el ciclo de zancada y el desplazamiento angular</i>	39
7.3.2.	<i>Cálculo de longitud, duración y velocidad del ciclo de zancada</i>	44
7.4.	<i>Análisis histológico del músculo sóleo y Extensor digitorum longus (EDL) con la tinción H-E</i>	46
7.4.1.	<i>Núcleos periféricos y centrales de las fibras musculares</i>	47
7.4.2.	<i>Área transversal de las fibras (CSA)</i>	49
7.4.3.	<i>Distribución de fibras por rangos del área transversal</i>	49
7.4.4.	<i>Dominio mionuclear (DMN)</i>	50
7.5.	<i>Características histoquímicas de los músculos sóleo y Extensor digitorum longus (EDL)</i>	51
7.5.1.	<i>Determinación del metabolismo de fibras mediante la histoquímica NADH-TR</i>	51
7.5.2.	<i>Determinación del fenotipo de las fibras mediante la histoquímica ATPasa básica pH 9.4</i>	52
8.	DISCUSIÓN	55
8.1.	<i>Efectos de la inmovilización en un periodo de 7 días sobre el ciclo de zancada</i>	56
8.2.	<i>Efectos de la inmovilización muscular durante un periodo de 7 días sobre las características histológicas de los músculos sóleo y Extensor digitorum longus (EDL)</i>	57

8.3	<i>Caracterización histoquímica de los músculos sóleo y Extensor digitorum longus (EDL)</i>	59
9.	CONCLUSIONES	61
9.1.	<i>Conclusión general</i>	61
9.2.	<i>Conclusiones particulares</i>	61
10.	PERSPECTIVAS	62
11.	APÉNDICE	63
11.1.	<i>Análisis de la locomoción del resto de los individuos del grupo control</i>	63
11.2.	<i>Análisis de la locomoción del resto de los individuos del grupo inmovilizado 7DA</i>	68
11.3.	<i>Análisis de la locomoción del resto de los individuos del grupo inmovilizado 7DD</i>	73
12.	REFERENCIAS	78

INTRODUCCIÓN

1.1. Músculo esquelético

Todo movimiento realizado por los vertebrados es generado gracias a la coordinación del músculo esquelético con el sistema óseo. Este tejido se ancla a un hueso por su extremo distal y a otro por su extremo proximal a través de tendones y utilizando las articulaciones (sistemas de palanca) genera el movimiento (Kraemer y Spiering 2007; Van Wessel y cols. 2010). En humanos, el músculo esquelético engloba casi el 50% del peso corporal y está conformado en un 75% por agua, un 20% por proteína y el 5% restante por otras moléculas tales como sales inorgánicas, minerales y grasas, entre otros (Salter 2000; Frontera y Ochala 2015). El sistema músculo esquelético convierte la energía química en energía mecánica que se utiliza para la generación de fuerza, mantener la postura y producir movimiento. Desde un punto de vista metabólico, contribuye a la energía basal almacenando sustancias importantes como aminoácidos y carbohidratos; produce calor, gasta oxígeno y energía durante la actividad física, entre otras, sirviendo como reservorio de nutrientes. Se ha observado que cuando se presenta una baja ingesta de ellos, las proteínas del músculo reemplazan la toma de aminoácidos de otros tejidos como la sangre (Wolfe 2006; Frontera y Ochala 2015).

El mantenimiento de la integridad y función del músculo esquelético durante la contracción está dado por la asociación entre el tejido conectivo y las fibras que lo componen (Järvinen y cols. 2002). Otros componentes importantes son los nervios y vasos sanguíneos que penetran el músculo en sitios determinados, se ramifican y abren paso hacia la profundidad a través del perimisio. El músculo puede estirarse ligeramente y regresar a su estado normal sin presentar daño, gracias al tejido conectivo (Kraemer y Spiering 2007; Moore y cols. 2002).

El músculo esquelético es un tejido heterogéneo compuesto por distintos tipos de fibras musculares (ver sección 1.3), contiene células mononucleadas no diferenciadas y especializadas conocidas como *células satélites* (SC; por sus siglas en inglés) localizadas en la periferia de las miofibrillas, debajo de la lámina basal, que participan en el crecimiento y regeneración muscular después de alguna lesión. Estas células se encuentran en un estado quiescente hasta que se presenta una lesión o un daño, se activan, promueven su proliferación, diferenciación y

regeneran las fibras musculares dañadas (Kraemer y Spiering 2007; Guo y cols. 2012; Sobrian y Walters 2013; Guitart y cols. 2017; Rodríguez y cols. 2020).

1.2. Contracción muscular

La unidad anatómica funcional de las fibras musculares son los sarcómeros donde encontramos las proteínas contráctiles (Fig. 1). La interacción entre la miosina y la actina permite la contracción muscular generando el movimiento. La *miosina*, también conocida como filamento grueso, está compuesta por 6 polipéptidos: dos cadenas pesadas y 4 cadenas ligeras. Además, presenta dos cadenas reguladoras y dos cadenas álcali de las cuales se compone cada filamento pesado (dos filamentos). La cabeza de miosina permite la interacción con la actina y es donde se encuentra el sitio de unión para el ATP, su hidrólisis lo convierte en ADP +Pi (Scott y cols. 2001). La *actina*, el filamento delgado, está conformada por proteínas de actina globulares que forman a la actina filamentosa; dos de estas unidas en forma de hélice conforman el filamento delgado. En ella encontramos dos proteínas reguladoras: la troponina y la tropomiosina, las cuales exponen el sitio de unión para la miosina durante la contracción muscular (Scott y cols. 2001).

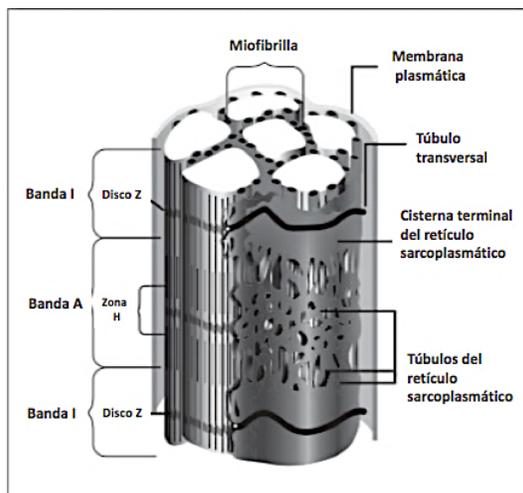


Figura 1. Estructura de un sarcómero. La unidad anatómica y funcional del músculo esquelético está compuesto por miofibrillas, túbulos transversales, retículo sarcoplasmático; está delimitado por dos líneas Z asociadas a la banda isotrópica, una zona H asociada a la banda A y la línea M (Traducido y modificado de Kraemer y Spiering 2007).

La troponina está conformada por tres subunidades: troponina I, troponina T y troponina C. Para realizar la contracción muscular, el Ca^{+2} interacciona con la subunidad troponina C y cambia la conformación de la tropomiosina, los puentes de unión de actina quedan libres para

la unión con la cabeza de miosina (Barret y cols. 2013). Mediante la hidrólisis de ATP se genera el deslizamiento de miosina sobre la actina y al llegar otro ATP la interacción actina- miosina se debilita y separa la cabeza de miosina de los puentes de unión de la actina. El ciclo se repite con la hidrólisis de otro ATP y la contracción muscular continuará hasta que el Ca^{+2} vuelva a ser recapturado al retículo sarcoplasmático y el músculo se relaje (Fig. 2). La velocidad de contracción muscular varía dependiendo el fenotipo de fibra que este presente (López-Chicarro y Fernández-Vaquero 2006; Kraemer y Spiering 2007).

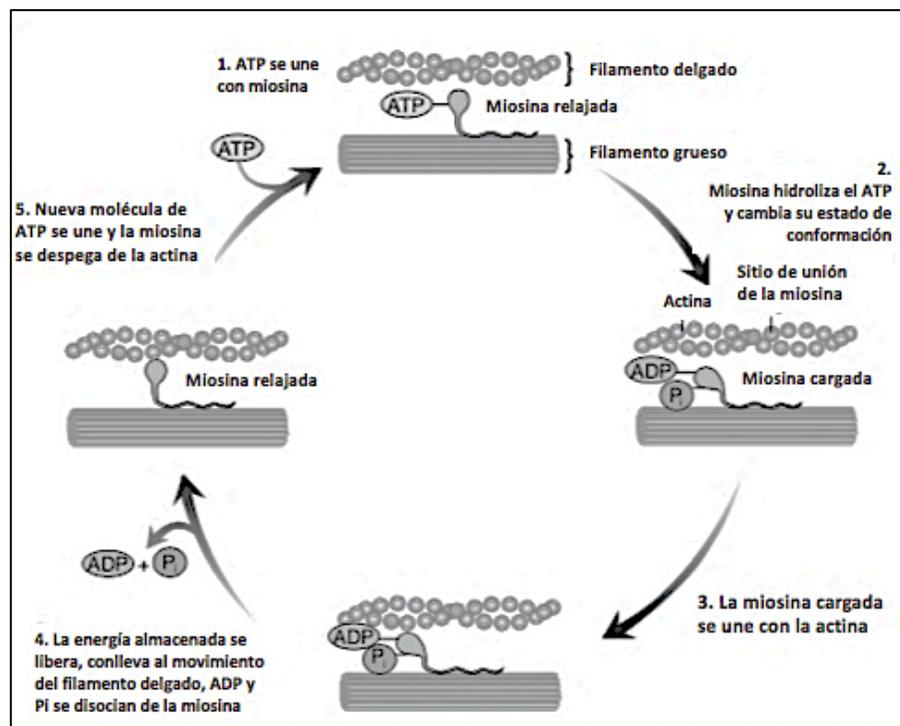


Figura 2. Mecanismo de contracción muscular. En el mecanismo de contracción muscular, el ATP se une con la cabeza de miosina que se encuentra relajada. Seguido, la miosina hidroliza el ATP, cambiando su estado de conformación a ADP + P_i . La cabeza de miosina ya cargada se une con el sitio de unión de la actina. La energía almacenada se libera ocasionando la contracción muscular. El ADP + P_i se disocian de la cabeza de miosina y esta vuelve a relajarse. Con la llegada de otra molécula de ATP, la cabeza de miosina se despega del sitio de unión de actina (Traducido y modificado de Kraemer y Spiering 2007).

1.3. Clasificación de las fibras musculares

A principios de los años 70's, las fibras musculares se clasificaron dependiendo el tiempo de contracción (lento o rápido) y/o coloración: en rápidas (blancas) y lentas (rojas), éstas últimas por el contenido capilar y mioglobina (Scott y cols. 2001; Tasić y cols. 2011). La clasificación de las fibras se realiza mediante la caracterización histológica, molecular, genética y proteica, entre otras. Cada tipo de fibra varía bioquímica y funcionalmente. Existen distintos tipos de fibras, los cuales se van a encontrar dependiendo del modelo animal (Murach y cols. 2016; Wall y cols. 2016; Rodríguez y cols. 2020). Se tienen tres principales tipos de fibras musculares los cuales se clasifican dependiendo el tipo de isoforma de la cadena pesada de miosina (MHC, por sus siglas en inglés) (Kraemer y Spiering 2007; Rodríguez y cols. 2020). Los tres principales tipos de fibras son: fibras lentas-oxidativas (tipo I), fibras intermedias glucolítica-oxidativa (tipo IIa/IIc) y las fibras rápidas-glucolíticas (IIb), estas fibras se van a encontrar en diferentes músculos, además de tener la capacidad de cambiar su fenotipo bajo ciertos criterios (ver apartado 2.2) (Kraemer y Spiering 2007; Tasić y cols. 2011; Schiaffino y Regianni 2011; Guertin 2011; Murach y cols. 2016).

- Fibras lentas-oxidativas (SO) o fibras tipo I. Presentan metabolismo aeróbico y tienen alta actividad de exoquinasas. Cuentan con mayor contenido mitocondrial, enzimas oxidativas y alta concentración de mioglobina. Presentan mayor cantidad de mionúcleos por mm de fibra y cuentan con una baja actividad de miosina, presentan menor concentración de fosforilasa y lactato deshidrogenasa. Se tienen pocas fibras musculares por unidad motora. Las fibras SO están conformadas por la MHCI y presentan bajo pico de tensión. Gracias a estas características, el músculo SO tiene fibras de contracción lenta, las cuales tienen mayor tiempo de relajación entre cada contracción y esto las hace muy resistentes a la fatiga (López-Chicarro y Fernández-Vaquero 2006; Kraemer y Spiering 2007; Van Wessel y cols. 2010).
- Fibras rápidas oxidativas-glucolíticas (FOG) o fibras tipo IIa/IIc. Presentan un metabolismo principalmente aeróbico debido a la actividad de succinato deshidrogenasa, alta concentración de mioglobina, citocromo, retículo sarcoplasmático y actividad alta-moderada glucolítica. Presenta moderada actividad

de lactato deshidrogenasa, la cual es importante en el sistema de transporte de α -glicerofosfato durante la regeneración de NAD en la glicólisis. Presenta bajo contenido mitocondrial en comparación con las fibras SO. Presenta mayor contenido de fibras por unidad motora y está conformado por la MHC IIa/IIc con un pico de tensión moderado. Gracias a estas características, estas fibras presentan contracción intermedia y cuentan con poco tiempo de relajación entre cada contracción en comparación con las fibras SO, lo cual ocasiona que tenga menor resistencia a la fatiga que las fibras SO, pero mayor que las fibras FG (Scott y cols. 2001; Kraemer y Spiering 2007).

- Fibras rápidas glucolíticas (FG) o fibras tipo IIb. Presentan un metabolismo principalmente anaeróbico. Cuentan con alta actividad de miosina, α -glicerofosfato deshidrogenasa. Presentan mayor contenido de autofagosomas, tienen alta concentración de glicógeno y de retículos sarcoplasmáticos en comparación con las fibras SO. Presentan baja concentración de citocromo, mioglobina y succinato deshidrogenasa. Se tienen muchas fibras por unidad motora, está conformado por la MHCII y tiene un alto pico de tensión en comparación con SO y FOG. Estas características generan contracción continua con periodos cortos o nulos de relajación entre cada contracción, lo cual ocasiona que no se tenga resistencia a la fatiga (Scott y cols. 2001; López Chicarro y Fernández Vaquero 2006; Kraemer y Spiering 2007).

Dentro de estos tres tipos principales de fibras, existen subtipos que vamos a encontrar dependiendo el modelo animal. Estos subtipos presentan características entre las fibras SO, FOG y FG, los cuales vamos a observar cuando se tenga una lesión muscular y comience el proceso de regeneración. El tipo de fibra que se encuentre contribuye en la respuesta del músculo hacia el ejercicio, carga o descarga, edad y las enfermedades (López-Chicarro y Fernández-Vaquero 2006; Murach y cols. 2016; Rodríguez y cols. 2020). Cualquier adición o disminución de mionúcleos también está relacionado con el aumento o disminución del tamaño de la miofibrilla. Estos cambios están asociados a procesos como la atrofia o hipertrofia muscular (Rosser y cols. 2002; Kraemer y Spiering 2007; Van Wessel y cols. 2010; Teixeira y Duarte 2016; Guo y cols. 2012).

El **dominio mionuclear** (DMN) es definido como el volumen de citoplasma asociado con un solo mionúcleo. Su tamaño está relacionado con el tipo de fibra muscular y la expresión de la cadena pesada de miosina (MHC) (Rosser y cols. 2002). Las fibras musculares se adaptan a las demandas de síntesis o degradación de proteínas dependiendo de los requerimientos del organismo. El volumen citoplasmático por mionúcleo es menor en fibras que expresan una MHC lenta en comparación con una MHC rápida. La expresión de MHC puede variar a lo largo de la fibra muscular (Rosser y cols. 2002; Kraemer y Spiering 2007; Teixeira y Duarte 2016). La isoforma de miosina y la actividad nerviosa presente son el principal determinante de la velocidad de contracción y por ende el tipo de fibra (López-Chicarro y Fernández-Vaquero 2006; Schiaffino y Reggiani 2011).

1.4. Locomoción: Patrones de movimiento y centros generadores de patrón

El sistema locomotor está constituido por distintos órganos y estructuras como el sistema nervioso central (SNC) conformado por el cerebro y la médula espinal. El cerebro consiste en sistemas asociados al control voluntario motor, piramidal y extrapiramidal, dichas estructuras constituyen los principales centros que controlan la contracción muscular voluntaria. Los comandos neuronales son enviados a neuronas y motoneuronas que están ubicadas en la médula espinal, en los cuales los comandos motores finales son enviados al músculo y se realizan los movimientos coordinados (Guertin 2011). Los centros generadores de patrones (CPG; por sus siglas en inglés) fueron descubiertos en el año de 1960 por Wiersma y Hughes. Posteriormente Wilson (1961) los estudió en animales vertebrados como los acociles y el insecto langosta. Los CPG's son un grupo de neuronas localizadas en el área lumbar de la médula espinal que se encargan de controlar los patrones de movimiento rítmicos básicos, los cuales son capaces de realizar un patrón de descargas espontáneas, produciendo actividad rítmica, además de activar o inhibir las motoneuronas espinales de distintos grupos musculares específicos (McCrea y Rybak 2008; Guertin 2011; Cucarián y cols. 2017). Los CPG's, se encuentran integrados en ganglios (controlan la actividad motora) y están conformados por una serie de redes neuronales organizadas como osciladores y acopladores, existen dos tipos principales (Yang y cols. 2017; Elices y Varona 2017; Klarner y Zerh 2018). El primero está basado en propiedades oscilatorias

intrínsecas de una o varias neuronas, las cuales son capaces de generar movimiento incluso en la ausencia de interacciones sinápticas. Estas neuronas son conocidas también como neuronas marcapasos y producen “olas” de potencial transmembranal. El segundo, está basado en redes donde la rítmicidad emerge de interacciones neuronales que no necesariamente presenta propiedades oscilatorias lentas en aislamiento. En algunas ocasiones estas interacciones sinápticas son excitatorias, sin embargo, generalmente están basadas en inhibición sináptica recíproca entre neuronas (Bucher y cols. 2015).

En la médula espinal también podemos encontrar presentes generadores espinales de movimiento (GEM; por sus siglas en inglés). Los GEM pueden fraccionarse en subunidades y controlar por separado el movimiento de cada una de las articulaciones de la extremidad (Rico-Mesa 2012). Las neuronas candidatas a ser CPG's presentan características específicas como: la capacidad de expresar endógenamente la actividad rítmica durante la locomoción, expresar propiedades auto rítmicas o de marcapasos, expresión del potencial de meseta, entre otros (Samson y cols. 2015; Elices y Varona 2017). Los CPG's son importantes para realizar actividades autónomas como la respiración, formación de memoria, actividades motoras cognitivas, locomotoras, entre otras. Una de las redes más complejas de los CPG's es para la locomoción, la cual controla los comandos básicos motores para la ambulación (Marder y Calabrese 1996; Samson y cols. 2015).

Los CPG's no solo generan una activación alterna entre los músculos flexores y extensores, sino también, un patrón más delicado que comenzará secuencialmente y terminará la actividad en los músculos apropiados en el momento correcto (Latorre 2004; McCrea y Rybak 2008; Yang y cols. 2017). Caminar requiere control coordinado de cada una de las articulaciones para producir la flexión y extensión de las extremidades, además de la coordinación entre las articulaciones para producir las fases de soporte y balanceo en cada pierna y la coordinación entre las piernas para poder producir un ciclo de paso correcto. La locomoción en mamíferos comienza por distintas neuronas moduladoras, las cuales activarán distintos grupos de neuronas intraespinales que promoverán diferentes actividades como caminar, correr, galopar, entre otras (Bucher y cols. 2015). La propiocepción es la sensación de la posición y movimiento de un cuerpo. La cual recae en poblaciones de neuronas mecano-sensoriales que están distribuidas por todo el cuerpo y se conocen como propioceptores. Se encuentran localizados entre los

músculos, tendones y uniones articulares. Cada tendón tiene terminaciones de una neurona mecano-sensorial envueltas en colágeno, las cuales están unidas a fibras musculares individuales. Estas neuronas aferentes inervan los tendones y codifican la fuerza muscular. En el ciclo de zancada de los gatos, las redes neuronales propioceptivas juegan un papel importante para realizar el ciclo del paso y en las transiciones en la fase inicial en el patrón motor. Existe influencia de las neuronas sensoriales que inervan los órganos propioceptores en la postura y el control del movimiento (Tuthill y Azim 2018). Las redes de CPG's no solo son multifuncionales porque pueden producir diferentes versiones del mismo comportamiento, sino, porque pueden coordinar diferentes formas de producir comportamientos distintos. Durante la locomoción, la retroalimentación de los propioceptores modula la magnitud y sincronización del CPG y la actividad muscular, para asegurar una salida robusta de la actividad (Bucher y cols. 2015). Durante el movimiento de una extremidad se tienen dos fases. Previo al inicio del ciclo de zancada, ocurre retroalimentación de las redes neuronales propioceptivas para que la extremidad esté en la posición correcta y se de inicio al ciclo de zancada. En seguida, mientras se realiza el movimiento, se liberan señales motoras refinadas para asegurar que la trayectoria de la extremidad sea la correcta y llegue al punto final. Cuando se realizan movimientos rápidos, la retroalimentación propioceptiva debe ser más rápida para evitar errores durante la zancada que puedan ocasionar lesiones (Bucher y cols. 2015; Tuthill y Azim 2018).

La **locomoción** es expresada de distinta manera entre organismos, sin embargo, existe evidencia de que el sistema neuronal de los CPG's es parecido entre especies. Para los humanos, su modo de andar es único, con el golpe de talón en el contacto inicial, respuesta de carga en la postura temprana, la actividad asincronizada de los músculos extensores y los flexores. Los movimientos coordinados resultantes de la alternancia entre los músculos flexores y extensores son producidos por neuronas espinales. Estas neuronas espinales pueden producir patrones motrices como la zancada (Guertin 2011).

En los roedores, para poder realizar el ciclo de zancada de manera homóloga entre las extremidades, se deben realizar una serie de movimientos básicos, los cuales están conformados por dos fases. Primero se presenta la fase de *balanceo*, durante esta fase, la extremidad del animal se encuentra fuera del contacto total con el piso, realizando la flexión de la extremidad para levantarla del suelo, con la misma flexión realiza el desplazamiento hacia delante. Al

finalizar esta fase, la extremidad comenzará su extensión y volverá a estar en contacto con el suelo. La cadera, rodilla y tobillo se mantienen flexionadas al inicio de la fase de balanceo y al finalizar se extiende la rodilla y tobillo, mientras que la articulación de la cadera permanece flexionada. Seguido, se presenta la fase de *soporte*, durante esta fase, la extremidad del animal se encuentra en contacto con el suelo y realiza el desplazamiento del cuerpo hacia enfrente mientras que la extremidad permanece sin movimiento. Al iniciar la fase de soporte, la cadera se encuentra flexionada y la rodilla y tobillo extendida. Al finalizar, la cadera se extiende mientras que la rodilla y tobillo se flexionan (Cárdenas-Hernández y Rodríguez-Sanchez 2007).

1.5. *Músculo sóleo*

El músculo sóleo es uno de los dos músculos flexores plantares principales de la articulación del tobillo situado de tal manera que al estar de pie impide que el cuerpo se vaya hacia enfrente, este músculo juega un papel importante durante la fase de soporte del ciclo de zancada, ya que contribuye para que se tenga una posición adecuada de la extremidad y se inicie la fase de balanceo (Palastanga y cols. 2007). En roedores al igual que en los humanos, el músculo sóleo es un músculo plano de la parte medial y estrecho de los extremos que se encuentra entre el gastrocnemio y el grupo peroneo. Se inserta en la parte posterior de la tibia, peroné y del arco fibroso entre las inserciones óseas. Las fibras musculares se encuentran extendidas hasta la pantorrilla y en la superficie profunda del tendón. Este tendón se corre sobre otro similar en la superficie profunda del músculo gastrocnemio, permitiendo el movimiento individual de ambos músculos (Fig. 3) (Palastanga y cols. 2007). El fenotipo maduro está caracterizado por el tipo de fibra lenta- oxidativa y expresa principalmente las isoformas MHC-I y MHC IIa, además, el 12% de los mionucleos totales pertenecen a células satélite. Aproximadamente solo el 10% de las fibras musculares del músculo sóleo son tipo glucolíticas (Van Wessel y cols. 2010; Schiaffino y Regianni 2011; Tasić y cols. 2011; Talbot y Maves 2016; Koulmann y cols. 2017). Las fibra musculares del sóleo presentan menor desarrollo del retículo sarcoplasmático y túbulos T en la superficie de la membrana. El fenotipo de fibras lentas permite que este músculo sea capaz de mantener tensión durante estimulación prolongada (Schiaffino y cols. 1970).

Estudios realizados en conejillos de india muestran que la inmovilización muscular de las extremidades posteriores afecta mayormente al músculo sóleo. La atrofia en este músculo ocurre rápidamente tras pocas semanas de inmovilización. Presenta atrofia en las fibras tipo I y fibras tipo II. Además, la actividad de ATPasa se ve afectada por la inmovilización (Tomanek y Lund 1973).

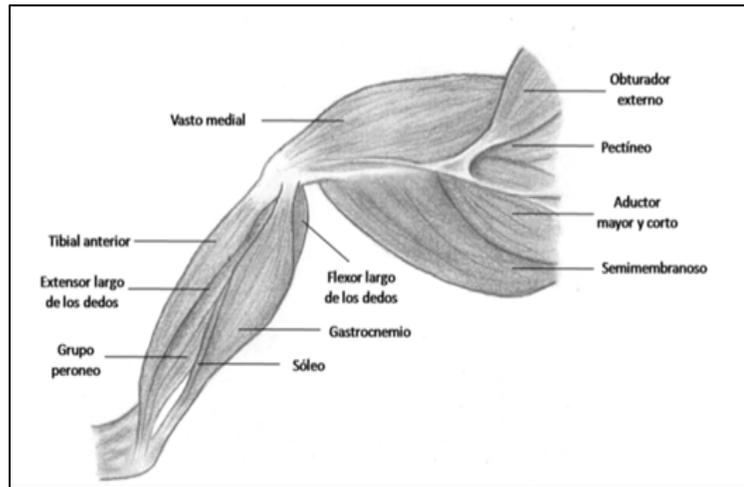


Figura 3. Localización y anatomía del músculo sóleo en roedores. Imagen obtenida de Palastanga y cols. (2007).

1.6. Músculo Extensor digitorum longus (EDL)

El músculo EDL contribuye en la extensión de las articulaciones interfalángicas y depende de músculos lumbricales para poder extender las articulaciones, contribuye también en la dorso flexión del pie, este músculo se va a encontrar activo durante el final de la fase de balanceo del ciclo de la zancada, este músculo contribuye al colocar la extremidad nuevamente en la superficie y comenzar un nuevo ciclo de zancada. (Palastanga y cols. 2007). En los humanos, el EDL se inserta en la cara anterior de la pierna de forma lateral respecto al músculo tibial anterior y cubre al músculo extensor del dedo gordo. Tiene origen lineal en dos tercios de la superficie anterior del peroné, músculo peniforme con su tendón en el lado medial y pasa por encima de la parte anterior de la articulación a nivel profundo del retináculo superior de los músculos extensores; sus fibras musculares se extienden hacia abajo y medialmente. Posteriormente, pasa a través del bucle del retináculo inferior de los músculos extensores acompañado por el músculo peroneo tercero (Fig. 4) (Palastanga y cols. 2007). Su tendón sirve de origen a cuatro tendones que se extienden hacia los cuatro dedos laterales unidos a una vaina sinovial común. En roedores es un músculo pinnado y fusiforme que se origina del tendón unido al epicóndilo lateral del fémur distal hacia el tobillo; se divide en 4 grupos donde cada uno se une a un tendón (Gordon y Thompson, 1987). Está compuesto principalmente por fibras rápidas con baja capacidad oxidativa, el 4% de los mionúcleos totales pertenecen a células satélites. Presenta fibras largas con baja actividad, fibras pequeñas con alta actividad y fibras intermedias. La distribución de las fibras no se encuentra equitativa en todo el músculo. Sus fibras ricas en mitocondrias se concentran en la parte medial del músculo (Schiaffino y cols. 1970; Van Wessel y cols. 2010). Cada fascículo del músculo EDL participa en la extensión de los dedos del pie y en las ratas en la dorsoflexión del tobillo (Rodríguez y cols. 2020).



Figura 4. Localización y anatomía del músculo EDL. Imagen obtenida de Balice-Gordon y Thompson (1987).
A. Vista frontal del músculo EDL, se muestra la extensión de los 4 tendones hacia los dedos de la pata del animal.

2. ANTECEDENTES

2.1. Alteraciones en el sistema locomotor

El sistema muscular estriado es controlado directamente por el SNC. Por lo cual después de una lesión en la médula espinal o inmovilización durante un periodo, se tiene una pérdida inmediata e incluso irreversible del control motor voluntario, esto dependiendo del grado de lesión (Guertin 2011). Existen distintos motivos por los cuales los CPG's se pueden llegar a ver afectados como lo son la enfermedad, lesión, inmovilización, sedentarismo, entre otras. El grado de alteración locomotora va a depender del tipo de lesión y del área del músculo. Previo a una lesión, el ciclo de zancada es simétrico y marcado con las fases de balanceo y soporte. Mientras que después de la lesión los pasos son asimétricos y las fases de soporte y balanceo se encuentran alteradas (De la Torre-Valdovinos y cols. 2016).

Manca y colaboradores (2020) realizaron un estudio en humanos que presentaban esclerosis múltiple, con la finalidad de comparar los efectos del entrenamiento contralateral y directo en parámetros espaciotemporal, cinemático y cinético. Encontraron que el entrenamiento contralateral es efectivo en pacientes que presentan debilidad unilateral. Este tipo de entrenamientos permiten fortalecer los músculos más débiles y posteriormente, se puede realizar un entrenamiento directo en ellos. El entrenamiento contralateral mejora el ciclo de zancada, la velocidad al caminar y ganar fuerza en la extremidad afectada. Personas con esclerosis múltiple realizan el ciclo de zancada en mayor tiempo, posterior al entrenamiento directo, presentaron disminución en el tiempo que les toma realizar la zancada. El entrenamiento contralateral muestra alteraciones por las redes neuronales. Entrenamiento unilateral no causa cambios en las adaptaciones musculares contralaterales. Esto muestra que el efecto de entrenamiento cruzado es mediado a nivel neuronal y no por mecanismos musculares. Estas adaptaciones incluyen excitabilidad cortico espinal, reducción en la inhibición espinal, interhemisférica y en la activación voluntaria (Manca y cols. 2020).

Harnie y colaboradores (2019), realizaron un estudio en el cual sometieron a gatos a una operación de médula espinal, con la finalidad de determinar si se necesita un entrenamiento

especial para la recuperación de la locomoción de las extremidades y el mantenerse de pie. Transcurridas las 6 semanas de entrenamiento y recuperación, se determinó que no se necesita un entrenamiento específico para la recuperación de carga de peso, locomoción de las extremidades, mantenerse de pie y la modulación de velocidad. El individuo comienza a recuperarlo poco a poco conforme mueve las extremidades y se tiene un retorno de la excitabilidad neuronal de los circuitos sensoriales de cada uno de los individuos. Se concluyó que a pesar de que tienen el mismo circuito sensorial todos los animales y la ubicación de los CPG's, el retorno de la excitabilidad neuronal de los circuitos sensoriales depende más bien de cada individuo (Harnie y cols. 2019).

2.2. Alteraciones en el músculo esquelético

Los trastornos músculo esquelético son todas aquellas lesiones y enfermedades que afectan al sistema de movimiento o músculo esquelético del cuerpo como tendones, ligamentos, nervios, vasos sanguíneos, entre otros (Salter 2000). El músculo esquelético, al tener una estructura tan compleja se defiende de las lesiones mediante un número limitado de reacciones como la atrofia, hipertrofia, necrosis y contracturas. La atrofia muscular se caracteriza por la pérdida de masa muscular, así como la disminución del tamaño o del CSA de una miofibrilla o un conjunto de miofibrillas ocasionado por la contracción muscular. Este proceso se basa en la pérdida de organelos, citoplasma, así como una disminución en la síntesis de proteínas, un incremento en el daño oxidativo y, por ende, la degradación de las proteínas. Al atenuarse las demandas transcripcionales y traslacionales, las miofibras pueden responder eliminando los mionúcleos (Boonyarom e Inui 2006; Bonaldo y Sandri 2013; Teixeira y Duarte 2016).

Existen distintas causas que ocasionan la atrofia muscular, desde enfermedades neuromusculares, inmovilización muscular por lesiones, viajes espaciales o sedentarismo, además, la atrofia muscular está presente como consecuencia secundaria ante problemas comunes de salud como edad, la fisiología del individuo, lesiones a nivel de médula espinal, actividad física, entre otras (Frimel y cols. 2005, Boonyarom e Inui 2006). La inmovilización prolongada ocasiona distintas alteraciones como la pérdida de extensión del músculo, se limita el movimiento de las articulaciones, hay incremento de tejido conectivo, entre otros. El tiempo

de inmovilización es el que determina el grado de lesión en el músculo, el cual al ser mayor ocasiona problemas incluso en hueso, médula espinal, cuello, entre otros que pueden llegar a ser irreversibles (Boonyarom e Inui 2006; Da Silva y cols. 2006; Guo y cols. 2012).

Un estudio realizado por Diogo y cols. (2019) evaluaron la recuperación de la médula espinal en ratas con lesión en esta área, en la cual observaron que lesiones de este tipo pueden resultar en la pérdida completa sensorial, motora y función autonómica. En muchas ocasiones la recuperación del ciclo de zancada previo a la enfermedad suele ser baja o más lenta. La recuperación además del tipo de lesión depende mucho de los músculos involucrados (Diogo y cols. 2019). Los músculos de fibras lentas presentan una recuperación más tardada, esto debido a que presentan mayor atrofia muscular. En comparación, los músculos que presentan fibras rápidas o intermedias presentan una recuperación más rápida (Frimel y cols. 2005, Boonyarom e Inui 2006).

Para poder realizar el ciclo de zancada y el mantenimiento de la postura se necesita el funcionamiento correcto en conjunto de distintos músculos de los miembros inferiores, dentro de ellos podemos encontrar los músculos sóleo y EDL, en los cuales se ha observado un incremento de distintas proteínas como la catepsina al tener ratas inmovilizadas por medio de suspensión. Dentro de los músculos podemos encontrar distintas proteínas como la catepsina, titina, neblina, entre otras, las cuales son esenciales para regular el espaciamiento, la unión y alineación correcta de los miofilamentos (Sandri 2013). Los músculos con fibras oxidativas contienen mayor nivel de catepsina y se tiene mayor potencial para degradar en estas fibras (Van Wessel y cols. 2010). En la edad adulta, la regulación de la masa muscular y el tamaño de la fibra es una consecuencia de la regulación proteica, en la cual se tiene un balance entre la degradación y síntesis de estas mismas (Sandri 2013). Las catepsinas lisosomales están involucradas en el rompimiento de proteínas sarcolémicas, canales y receptores. Las proteínas lisosomales al estar inhibidas se contribuyen en el síntesis de proteínas.

A nivel celular, las fibras musculares pierden sarcómeros y presentan pérdida de endotelio. Se presenta una reducción de mitocondrias, incremento de tejido conectivo, reducción de capilares y eliminación de mionúcleos por medio de apoptosis. En ratas, las fibras tipo I presentan mayor número de mionúcleos por unidad de longitud que las fibras tipo II. Ante una

lesión, las fibras tipo I presentan mayor pérdida de mionucleos que las fibras tipo II (Hoppeler y Fluck 2003; Boonyarom e Inui. 2006).

Durante la etapa de adulto, el cuerpo se puede adaptar a distintas condiciones patofisiológicas mediante la activación y control de vías reguladoras de proteínas (Bonaldo y Sandri 2013; Trevino y cols. 2019). Existen distintas vías que controlan la atrofia muscular bajo ciertas condiciones fisiológicas y patológicas como:

- El *sistema ubiquitina-proteosoma*, se requiere para remover proteínas sarcoméricas al ocurrir cambios en la actividad muscular. La disminución de masa muscular está asociada con distintos factores como: el incremento de la conjugación de la ubiquitina con las proteínas musculares; incremento en el rompimiento de proteína que es bloqueada por inhibidores proteosomales; incremento en la actividad dependiente del ATP proteosomal y la regulación de las transcripciones de la codificación de la ubiquitina, enzimas conjugadas de ubiquitina (E2) y ligasas de ubiquitina-proteína (E3) (Bonaldo y Sandri 2013; Trevino y cols. 2019). En el genoma humano existen más de 650 ligasas de ubiquitina, las cuales regulan distintos procesos celulares, metabólicos, transcripcionales, ciclos celulares, entre otros. Durante la atrofia muscular encontramos genes que regulan este mecanismo (atrogenes) los cuales codifican a dos ubiquitinas musculares específicas: MAFbx y MuRF1. Durante la denervación se requiere de la regulación del factor miogenina para así poder activar los atrogenes. El gen MuRF1 interactúa y controla proteínas estructurales importantes del músculo, una de ellas es la troponina I, cadena pesada de miosina (MHC), cadena ligera de miosina (MLH) y la miosina que se une a la proteína C. Se han reportado distintas ligasas involucradas en la atrofia muscular. Trim32 es una ligasa E3 importante para la degradación de filamentos como la actina, tropomiosina y troponina, así mismo la ligasa TRAF6 media la conjugación de las cadenas Lys64-poliubiquitina con sus proteínas objetivo. Esta última ligasa juega un papel importante en la degradación del proteosoma dependiente, en la regulación de vías reguladoras celulares y en el reconocimiento del autofago dependiente mediante la proteína scaffold p62. Al inhibir a la ligasa TRAF6, se previene la pérdida de masa muscular bajo condiciones catabólicas (Paul y cols. 2010; Cohen y cols. 2012; Bonaldo y Sandri 2013). La proteína CHIP se encuentra en la línea-Z de los sarcómeros

y ocasiona la degradación del filamento C. Así mismo, el filamento B es controlado por la ligasa ASB2 β , el cual se expresa en las células musculares. La proteína Fbxo40 al estar inhibida por el RNAi induce hipertrofia en los miotubulos; en ratones knockout se ha encontrado que presentan fibras musculares de mayor tamaño (Shi y cols. 2011). Las proteasas procesadoras específicas de ubiquitina (USPs, por sus siglas en inglés) son importantes durante la atrofia muscular. En ratones knockout se ha encontrado que, al estar inhibida su expresión en los miotúbulos se tiene una disminución en la degradación de proteína y revierte la pérdida de MHC (Bonaldo y Sandri 2013).

- El *sistema autofagia lisosomal*, es importante en la regulación de componentes celulares durante condiciones constructivas y durante la respuesta de varios estímulos como el estrés celular, privación nutricional, entre otros (Bonaldo y Sandri 2013; Sandri 2013). Existen tres sistemas que se han encontrado en los mamíferos, macroautofagia (proceso en el cual los sustratos son secuestrados en los autofagosomas, se incluyen orgánulos dañados, proteínas citosólicas, entre otros), autofagia chaperona mediada (CMA, por sus siglas en inglés; vía lisosomal de proteólisis, responsable de la degradación del 30% de proteínas citosólicas que se encuentran en condiciones prolongadas de bajos nutrientes, estrés oxidativo, etc.) y microfagia (mediada por acciones lisosomales, importante para reciclar nutrientes cuando estos se encuentran en bajos niveles, es uno de los mecanismos que llevan glucógeno a los lisosomas) (Bonaldo y Sandri 2013; Yang y cols. 2017; Oku y Sakai 2018). La degradación lisosomal contribuye en la degradación de proteínas en músculos denervados. La autofagia es un mecanismo de degradación no selectivo, en el cual se ha encontrado que puede degradar ciertos organelos como las mitocondrias mediante mitofagia (Feng y cols. 2014; Trevino y cols. 2019). En los humanos existen distintos genes que regulan la mitofagia, la inactivación de estos genes codificantes ocasiona mitocondrias anormales. La autofagia puede contribuir en la degradación muscular pero también ser un mecanismo de supervivencia celular. Existe evidencia de que la autofagia es protector ante la debilidad y desgaste muscular en distintos desórdenes musculares asociados con deficiencia de colágeno VI (Bonaldo y Sandri 2013).

- La vía *IGF-1* es el mediador para el crecimiento muscular, la inactivación de mTOR ocasiona poca síntesis de proteínas y atrofia de miocitos. Esta vía está regulada principalmente por los mecanismos anteriormente mencionados, la vía de autofagia-lisosomal y la vía ubiquitina-proteosoma incluyendo MuRF1 y F-box. La expresión de *Trim 63* y *Fbxo32* (genes codificantes para MuRF1 y atrogin-1, respectivamente) están regulados en parte por los factores transcripcionales FoxO1 y FoxO3, estos factores son inactivados por la fosforilación mediante Akt regulando directamente la vía IGF-1. La activación de Akt en miofibrillas de adultos bloquea completamente la atrofia muscular ocasionada por denervación y promueve el crecimiento del músculo. Estudios han mostrado que esta vía puede suprimir el rompimiento de proteínas mientras se está promoviendo el crecimiento muscular (Bonaldo y Sandri 2013; Trevino y cols. 2019).

La regulación mitocondrial es importante para preservar un correcto funcionamiento de los músculos y la regulación general del metabolismo, este organelo cambia morfológica y cuantitativamente como consecuencia de la actividad muscular, vinculándose a los procesos de atrofia cuando estas no desempeñan bien su función (Sandri 2013). Los sistemas de degradación anteriormente mencionados están controlados por un programa dependiente transcripcional que modula la expresión de enzimas de los sistemas proteolíticos. La atrofia muscular es uno de los principales efectos secundarios que se van a encontrar después de una operación, inmovilización, entre otras, ocasionado por la inactividad contráctil prolongada (Bonaldo y Sandri 2013; Sandri 2013; Trevino y cols. 2019).

Debido a la edad, enfermedades, desnutrición, un estilo de vida sedentaria, lesiones, entre otras, las fibras musculares se pueden llegar a ver afectadas ocasionando un cambio en sus propiedades contráctiles y estructurales. Las fibras musculares denervadas presentan atrofia y son de un 30-50% más pequeñas en comparación con las fibras musculares inervadas en ratas de mayor edad (Scalabrin y cols. 2019; Rodríguez y cols. 2020). Además, se ha demostrado que, sin importar la edad, las personas que presentan un tipo de vida sedentaria tienen de 45-55% de fibras lentas o tipo I (López-Chicarro y Fernández-Vaquero 2006). Las personas que llevan una vida sedentaria se encuentran mayormente predispuestas en presentar una lesión a nivel

muscular, esto por consecuencia generará que se tengan cambios en el fenotipo de la fibra, el tamaño del CSA e incluso alteraciones mayores a nivel locomotor (Harnie y cols. 2019).

2.2.1. Alteraciones musculares por inmovilización

Después de haber padecido cualquier tipo de lesión o tener una vida extremadamente sedentaria, se presentan múltiples daños intramusculares a diferente magnitud en músculos como el sóleo y el EDL, ocasionados no solo por la lesión sino también por la falta de movimiento en el miembro inmovilizado o por reposo completo en cama (Wall y cols. 2016). El nivel de daño dependerá del tipo de lesión, tipo de músculo lesionado, posición del miembro lesionado y el tiempo de inmovilización (Salter 2000; Da Silva y cols. 2006). Un estudio realizado en humanos evaluó el daño ocasionado a nivel muscular tras una inmovilización de rodilla por un periodo de 5 días. Durante este tiempo se les administraron las proteínas L-fenilalanina y L-leucina, concluido el periodo de inmovilización se encontró una disminución en el CSA en el cuádriceps de la pierna inmovilizada, lo cual puede estar asociado a la disminución de la síntesis proteica ocasionada por el desuso muscular (Wall y cols. 2016). Las propiedades contráctiles de los músculos con fibras tipo I, después de una lesión o inmovilización, comienzan a tener propiedades de fibras tipo II; mientras que las fibras tipo II no presentan cambios en el fenotipo (Salter 2000). Se ha registrado que las fracturas a nivel de tibia son las lesiones más frecuentes del sistema músculo esquelético debido al aporte vascular y características anatómicas, ocasionando deformidad e incapacidad de movimiento permanente, así como incremento de la probabilidad de presentar afectaciones mayores en un futuro. Cada lesión debe ser tratada de manera individual, considerando las características específicas que presenta cada paciente como genética, actividad diaria, tipo de lesión, lesiones previas, por mencionar algunas (Ruíz-Martínez y cols. 2001; Lovato-Salas y cols. 2015).

Un estudio de inmovilización por suspensión (en ratas) tuvo como resultado una disminución de la proliferación de células satélite, así como su incorporación en el músculo dañado (Hikida y cols. 1997). Un estudio realizado por Darr y Schultz (1987) donde utilizaron un modelo de suspensión de las extremidades posteriores en ratas en crecimiento encontraron una disminución de proliferación e incorporación de células satélite (Darr y Schultz 1987).

Además, Hikida y cols. (1997) mencionan que en un estudio realizado en ratas del programa Space Shuttle Endeavour/SE-03 1993 de la NASA, el cual tenía como finalidad determinar la distribución mionuclear en relación con el tamaño de la fibra muscular y cambios en las fibras, observaron que las ratas experimentales presentaron entre un 71-96% de fibras tipo I, en comparación con las ratas control (74-92%), mientras que en las fibras tipo II no se presentaron diferencias entre los grupos. En el grupo experimental se pudo observar que el 23.4% de las fibras tipo I presentaron atrofia, mientras que el 12.5% de fibras tipo II se atrofiaron, mientras que el grupo control no presentó atrofia. En este mismo estudio se sugiere que después de un largo tiempo de desuso muscular se puede ocasionar un cambio en el fenotipo de las fibras principalmente en las fibras tipo I generando un cambio de fibras lentas a rápidas. (Hikida y cols. 1997). Teixeira y Duarte (2016) reportan que experimentos realizados en el músculo sóleo de ratas inmovilizadas por medio de suspensión presentaron una pérdida del DMN al igual que una reducción del CSA (Teixeira y Duarte 2016).

En modelos de lesión en médula espinal (en la rata), el músculo sóleo presenta una atrofia extendida, además de comenzar a presentar características de fibras tipo II, una disminución en la fuerza tetánica máxima y en la fuerza de contracción nerviosa máxima. Después de 10 días de lesión se encontró una reducción de hasta el 40% de CSA (Guertin 2011). En modelos de suspensión de las extremidades posteriores se ha reportado una reducción en las proteínas de las miofibrillas tipo I. Por el contrario, en el músculo EDL las alteraciones no son tan evidentes dos semanas después de una lesión en la médula espinal o inmovilización, esto debido a que presentan fibras tipo II (Hikida y cols. 1997).

Los cambios a nivel muscular se ven influenciados también por la posición en la que se mantenga el miembro lesionado. Por una parte, la inmovilización del miembro en posición acortada reduce el número de sarcómeros y aumenta la atrofia muscular ocasionando pérdida de masa muscular (reducción a lo ancho, largo y dureza). Por otra, la inmovilización en posición alargada ocasiona un incremento en el número de sarcómeros, tejido conectivo (endomisio y perimisio), pérdida de fuerza y aumento de rigidez en las articulaciones y ligamentos (Coutinho y cols. 2002). La inmovilización muscular en una posición acortada ocasiona atrofia tanto en el músculo sóleo como en el músculo EDL (Frimel y cols. 2005, Boonyarom e Inui 2006). No obstante, existen alteraciones que ocurren sin importar la posición del miembro lesionado como

la pérdida de flexibilidad, incremento de tejido conectivo, fibras de colágeno orientadas de forma perpendicular, disminución en el contenido de proteína, diámetro de las fibras y la fuerza del músculo. De igual manera, la hipocinesia, disminución de la velocidad y extensión de movimiento voluntario, producen cambios en las fibras del músculo esquelético, reduciendo el número de células satélite y suprimiendo su actividad mitótica haciéndolas susceptibles a apoptosis (Järvinen y cols. 2002, Guo y cols. 2012, Teixeira y Duarte 2016). La pérdida de masa muscular en los miembros posteriores está relacionada con la pérdida de fuerza muscular sin importar la edad. Esto se atribuye a la disminución de fibras musculares. Existe una mayor disminución en fibras musculares tipo II, teniéndose pérdida de células satélite. Se ha observado que esto tiene gran influencia en la atrofia muscular. A nivel mioelular conforme al aumento de edad, las fibras tipo II tienen menor CSA que las fibras tipo I (Verdijk y cols. 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

En los mamíferos, después de haber sufrido una lesión e inmovilizar la extremidad para asegurar su recuperación se han observado alteraciones en el músculo esquelético involucrado y en su función, reflejado en cambios que componen el proceso de la locomoción como el ciclo de zancada. Algunas de las alteraciones reportadas se asocian con cambios histológicos en sus fibras musculares, principalmente. Esto es capaz de modificar su función locomotora comprometiendo la calidad de vida del individuo. Por lo anterior, en el presente trabajo se pretenden determinar los efectos de la inmovilización por 7 días en la extremidad posterior derecha sobre la locomoción y las características histológicas (H-E) e histoquímicas (ATPasa pH 9.4 y NADH-TR) de los músculos sóleo y EDL de la extremidad ipsilateral a la inmovilización en la rata hembra. Esto con la finalidad de conocer los efectos de la inmovilización muscular breve sobre los procesos de lesión y cambios fenotípicos de las fibras de dos músculos distintos fenotípicamente; y así generar conocimiento básico que sea precedente para la elaboración de terapias músculo-específicas que puedan disminuir el tiempo de recuperación y las alteraciones fisiológicas asociadas que mejoren la calidad de vida de los individuos.

4. HIPÓTESIS

La inmovilización de la extremidad posterior derecha por 7 días desorganiza los componentes de la locomoción y afecta en mayor medida las características histológicas, metabólicas y fenotípicas de las fibras del músculo sóleo que las del EDL en la rata hembra.

Predicciones:

La inmovilización de la extremidad posterior derecha en la rata hembra:

- Desorganizará el patrón del ciclo de zancada en la extremidad ipsilateral y contralateral.
- Disminuirá la longitud, duración y velocidad de la zancada; así como la apertura de los ángulos máximos y mínimos en la extremidad ipsilateral y contralateral.
- Incrementará el número de núcleos centrales mayormente en el músculo sóleo que en el EDL.
- Incrementará el porcentaje de fibras lentas en el músculo EDL, pero no en el sóleo.
- Provocará una mayor atrofia muscular en el músculo sóleo que en el EDL.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo general*

Determinar los efectos de la inmovilización de la extremidad posterior derecha por 7 días sobre la locomoción y las características histológicas e histoquímicas del músculo sóleo y EDL en la rata hembra.

5.2. *Objetivos particulares*

En ratas control e inmovilizadas:

1. Evaluar la longitud, duración y velocidad de la zancada antes y después de la inmovilización en la extremidad ipsilateral y contralateral.
2. Evaluar el patrón del ciclo de zancada, los ángulos de apertura, desplazamiento angular y movimiento de las articulaciones antes y después de la inmovilización de la extremidad ipsilateral y contralateral.

En músculo sóleo y *Extensor digitorum longus* (EDL):

1. Cuantificar el número de núcleos centrales y periféricos; así como el área de las fibras (CSA) y dominio mionuclear (DMN) utilizando la tinción de H-E.
2. Identificar y cuantificar el metabolismo de las fibras mediante la técnica de NADH-TR.
3. Identificar y cuantificar los tipos de fibras mediante la técnica de ATPasa básica (pH 9.4).

6. METODOLOGÍA

6.1. Animales

Se utilizaron 12 ratas hembra jóvenes de la cepa Wistar de un peso de 230 ± 10 g. Las ratas se alojaron en cajas individuales de plástico con tapa de acero inoxidable en condiciones estándar (16 h/ 8h de luz y oscuridad; 22 ± 2 ° C) en el bioterio de la Universidad Popular del Estado de Tlaxcala (UPET) y recibieron alimento (18% proteína) y agua *ad libitum*. Ambos grupos estuvieron conformados por ratas hembra vírgenes. El grupo control (C, n=6) no se sometió a ningún protocolo de inmovilización, el grupo inmovilizado (I, n=6) fue sometido a un protocolo de inmovilización de la extremidad posterior derecha en un periodo de 7 días.

6.2. Protocolo de inmovilización de la extremidad posterior derecha

Para realizar la inmovilización, las ratas fueron pesadas y anestesiadas con pentobarbital sódico 50mg/kg vía subdérmica. La inmovilización se realizó en la extremidad posterior derecha (ipsilateral) y se le colocó un poco de algodón en la región del tobillo y se vendó la extremidad con una venda elástica. Posteriormente, se le colocó venda de fibra de vidrio (3M Scoothcast) comenzando por la parte distal de la extremidad y subiendo hasta la cintura. Esta venda está cubierta con resina de poliuterano, la cual al entrar en contacto con el agua se polimeriza y se seca adquiriendo una consistencia rígida. Las ratas fueron colocadas en una cama térmica hasta que pasara el efecto de la anestesia. El beneficio de este tipo de venda es que es ligera y permite la transpiración de la piel lo que evitaría una posible ulceración. Finalmente, para evitar que la rata se lesionara o mordiera la venda de fibra de vidrio, se le colocó cinta de curación y algodón en los extremos (Fig. 5). Durante el periodo de inmovilización se realizaron mínimo dos visitas al día para verificar que el individuo continuara con la inmovilización, no presentara lesiones y no tuviera problemas para tener acceso al agua y al alimento, mismo que se lo colocaba también en la parte interna de la caja.



Figura 5. Técnica de inmovilización para el grupo Inmovilizado (I). La imagen muestra un individuo inmovilizado, al cual se le colocó una fibra de vidrio en la extremidad derecha asegurada con cinta adhesiva de curación.

6.3. Citología vaginal

Se realizó análisis de la citología vaginal para ambos grupos con la finalidad de poder determinar la fase del ciclo estral en la que se encontraban. La técnica consistió en colocar la rata en una posición dorso ventral y con la ayuda de una pipeta pasteur y agua destilada, se introdujo en el orificio vaginal. Aspirando de dos a tres veces el contenido fue recuperado (obtención de células del epitelio que recubre el cuello uterino). De la muestra obtenida, se realizó el frotis colocando una gota de muestra en porta objetos; se dejó secar y se tiñó con Lugol o Wright. Las muestras se observaron bajo el microscopio óptico con los objetivos de 4x y 10x y basándonos en la literatura (Marcondes y cols. 2002; Paccola y cols. 2013) se determinó la fase del ciclo estral.

6.4. Análisis de la locomoción

El análisis del ciclo de zancada se realizó tanto para el grupo C como para el grupo I. Para el caso del grupo I, se realizó un análisis del ciclo de zancada 7 días antes de la inmovilización (7DA) y 7 días después de la inmovilización (7DD). Para el grupo C únicamente se realizó el análisis a los 7DD del grupo I. La prueba se realizó en un túnel de acrílico transparente de 1.20 m x 30 cm (Fig. 6).

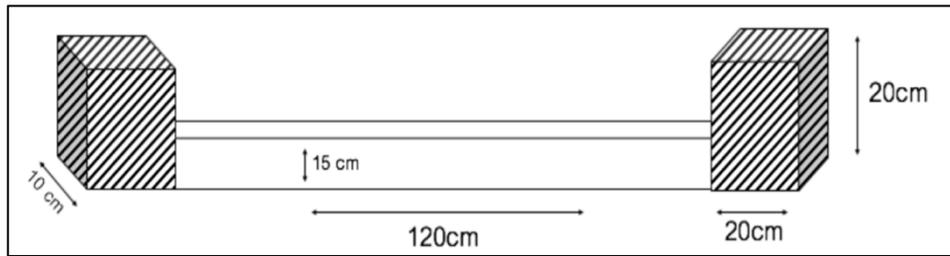


Figura 6. Representación de túnel de acrílico para el análisis de la zancada.

El túnel contaba con marcas cada 5 centímetros con la finalidad de poder medir posteriormente la longitud de zancada. Se realizaron pruebas de adaptación al túnel de acrílico. A cada individuo se le colocaron en ambas extremidades posteriores 4 marcas con plumón indeleble no tóxico en las siguientes articulaciones: cresta iliaca, cadera, tobillo, tarso-metatarso, la articulación de la rodilla no se colocó debido a que el programa automáticamente lo calculaba (Fig. 7).

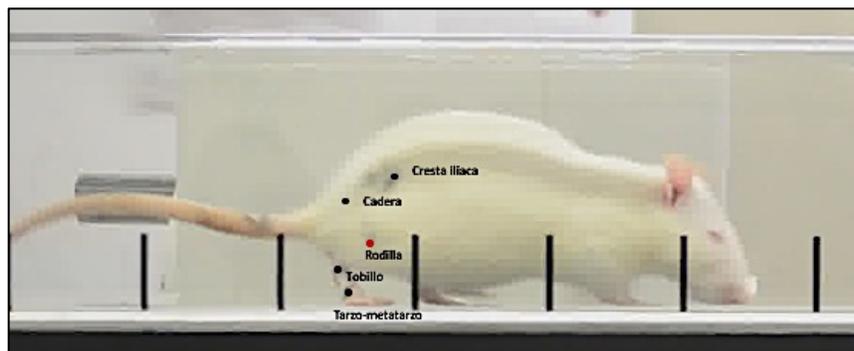


Figura 7. Representación esquemática de los puntos de referencia para el análisis del ciclo de zancada. Se colocaron marcas con plumón indeleble en la cresta iliaca, cadera, tobillo, tarso-metatarso. La marca de la rodilla (en rojo) es únicamente para ubicar su posición en la extremidad del individuo.

Para realizar el análisis del ciclo de zancada, se videograbó con una cámara (Nikon 5100) de 16.2 mp a 30 cps tanto la extremidad posterior ipsilateral como contralateral. Se filmaron por lo menos 3 zancadas seguidas sin tomar en cuenta la primera y la última zancada del animal. Con el programa Total Video Converter, se convirtieron los videos a formato .JPG. Para el caso de la filmación contralateral, los videos se giraron horizontalmente para que se pudieran correr en el programa. Una vez obtenidas las imágenes, se tomaron las coordenadas de las 4 marcas de las extremidades en el programa FIJI.

Los datos (coordenadas) obtenidos de las 3 zancadas seguidas se introdujeron al software MatLab y se ejecutó un programa realizado por López-Ruíz y cols. Es importante destacar, que el programa calculaba automáticamente el movimiento de la rodilla, por lo cual no se colocó la marca en el animal. Se obtuvieron 3 gráficas: en la primera se muestra la secuencia de movimientos del miembro durante el ambulante; en la segunda gráfica se muestra el grado de apertura de la cadera, rodilla, tobillo y movimiento tipo péndulo (el cual se calcula automáticamente en el programa tomando el movimiento de la cadera y el tobillo durante el ciclo de zancada); finalmente, en la tercera gráfica se muestra el movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie durante el ciclo de zancada. Con base a las gráficas obtenidas se observaron los cambios a consecuencia de la inmovilización posterior durante 7 días en la extremidad ipsilateral y la contralateral.

6.4.1. Análisis de ángulos máximos (extensión) y mínimos (flexión) de las articulaciones en el ciclo de zancada y desplazamiento angular

Para el cálculo de los grados de apertura mínima y máxima, se tomaron los valores de la gráfica de grado de apertura de las articulaciones de cada uno de los individuos y se graficaron las diferencias entre los 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) de la inmovilización para el grupo inmovilizado con el programa PRISM 6.0c.

Para el desplazamiento angular (X) se utilizó la siguiente fórmula:

$$X = M_i - M_a$$

Esta fórmula usa el grado mínimo de apertura (M_i) y el grado máximo de apertura (M_a) de la articulación. Posteriormente se graficaron con ayuda del programa PRISM 6.0c para así observar las diferencias entre los 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) del grupo inmovilizado.

6.4.2. Cálculo de longitud, duración y velocidad del ciclo de zancada

La medición de la longitud de zancada se realizó para los videos 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) ipsilateral y contralateral tanto en el grupo control como el inmovilizado. Se utilizaron las mismas imágenes obtenidas de los videos del análisis del ciclo de zancada. Con ayuda del programa FIJI, se realizó la medición en centímetros de las mismas zancadas que se utilizaron para graficar el ciclo de zancada. Esto se realizó con 3 zancadas obteniendo la media y se graficó en el programa de PRISM 6.0c para observar las diferencias entre 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) del grupo inmovilizado (I).

Para el cálculo de la duración de la zancada (X) se utilizaron las imágenes obtenidas del video para el análisis del ciclo de zancada, con ayuda del programa FIJI, se cuantificó el número de fotogramas que tardó en realizar la zancada y se utilizó la siguiente fórmula:

$$X = NF / CPS$$

Donde X es la duración de zancada, NF, el número de fotogramas que tardó en realizar el ciclo de zancada y CPS los cuadros por segundo a los que se video grabaron los individuos (30cps). Esto se realizó en las tres zancadas tanto de la extremidad ipsilateral como la contralateral, una vez obtenido los datos por extremidad e individuo se obtuvo la media y se graficó con ayuda del programa PRISM 6.0c y se observaron las diferencias en la duración de la zancada entre 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) del grupo inmovilizado (I).

Finalmente, para el cálculo de la velocidad de la zancada (X) se utilizó la siguiente fórmula:

$$X = d / t$$

Donde X es la velocidad de la zancada, d, es la distancia (longitud) que recorrió durante el ciclo la zancada y, t, es el tiempo (duración) en realizar un ciclo de zancada. Esto se realizó en las tres zancadas tanto de la extremidad ipsilateral como la contralateral, una vez obtenidos los datos por extremidad e individuo, se obtuvo la media y se graficó con ayuda del programa PRISM

6.0c y se observaron las diferencias en la duración de la zancada entre 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) del grupo inmovilizado (I).

6.5. Disección, fijación e inclusión de los músculos sóleo y Extensor digitorum longus (EDL)

Las ratas se colocaron en posición decúbito dorsal para ser anestesiadas por vía intraperitoneal (pentobarbital sódico 50mg/kg). Una vez anestesiadas se realizó una incisión en la extremidad derecha desde la rodilla hasta el tobillo. La longitud y ancho de los músculos fueron medidos previo a la extracción. Posterior a la documentación de los parámetros morfométricos, los músculos fueron extraídos, secados y pesados para posteriormente ser congelados acetona, utilizando isopentano como crioprotector. Una vez congelados, los músculos fueron almacenados a -70 °C para su posterior análisis.

6.6. Análisis histológico del músculo sóleo y Extensor digitorum longus (EDL) con la tinción de H-E

Se realizaron cortes seriados de 10µm de grosor obtenidos con un criostato (Leica) a -25° C y fueron colocados en diferentes portaobjetos. Las secciones transversales obtenidas de la parte medial de cada músculo fueron teñidos con hematoxilina-eosina para evaluar las características histológicas como número de núcleos centrales y periféricos, así como el CSA. Los cortes se hidrataron y se colocaron en agua destilada durante 1 min , seguido de la tinción con hematoxilina de Harris durante 15 min. Posteriormente las muestras se lavaron con agua corriente durante 1 min, se colocaron en alcohol amoniacal durante 3 min. Las muestras se lavaron con agua destilada durante 5 min. Se colocaron en etanol al 80% y se dejaron reposar durante 1 min. Finalmente se colocaron en la eosina y se prosiguió con la deshidratación de los tejidos teñidos, para ello las muestras se colocaron en alcoholes de concentraciones ascendentes (70-100%) por 1 min en cada uno hasta llegar al alcohol absoluto. Finalmente, para el proceso de aclarado, las muestras se colocaron en alcohol-xilol durante 1 min. Posteriormente, se colocaron dos veces en xilol durante 1 min.

Finalmente, las preparaciones se observaron en un microscopio de luz visible (Nikon DSRI1), se fotografiaron las muestras completas por secciones con una cámara OLYMPUS CX31 (magnificación 20X) y se realizó la reconstrucción del músculo completo utilizando el programa Photoshop CS4 para obtener la imagen completa del músculo.

El conteo de los núcleos y la medición del área de las fibras musculares se realizaron en 35 fibras por músculo, por animal (magnificación 20X). Con estos datos se realizó el cálculo de DMN para cada animal y por grupo. Para calcular el dominio mionuclear (X), se utilizó la siguiente fórmula:

$$X=(CSA/NP)$$

Esta fórmula usa el CSA y el número de núcleos periféricos por fibra muscular (NP). El análisis cuantitativo se realizó utilizando el programa FIJI (versión 1.45 para mac).

6.7. Características histoquímicas del músculo sóleo y Extensor digitorum longus (EDL)

6.7.1. Determinación del metabolismo de las fibras mediante la histoquímica NADH-TR

En los cortes siguientes al que se realizó la tinción de H-E de cada músculo, se realizó la histoquímica de NADH-TR. Para ello, los cortes fueron llevados a temperatura ambiente y colocados en una solución de NADH-TR (Tris buffer 0.05 M pH 7.6, NADH, Nitro-Blue Tetrazolium -NBT-) a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, se realizaron entre 7 y 10 lavados con agua destilada. El exceso de color fue removido utilizando soluciones ascendentes de acetona (50, 60 y 80%) durante 1 min en cada concentración. Se dejaron secar y se cubrieron con medio de montaje y cubre objetos.

Finalmente, las preparaciones se observaron en un microscopio de luz visible (Nikon DSRI1) y se fotografió la muestra completa por secciones con una cámara OLYMPUS CX31 (magnificación 20X) y se realizó la reconstrucción utilizando el programa Photoshop CS4 para obtener la imagen completa del músculo. El análisis cuantitativo se realizó en el programa FIJI (versión 1.45 para mac). Identificando como fibras oxidativas aquellas que presentaron un color

azul intenso en la totalidad de la fibra. Consecuentemente, las fibras con una actividad oxidativa moderada (azul muy claro) fueron catalogadas como glucolíticas. Se contaron todas las fibras de cada músculo y los datos obtenidos se reportaron como porcentaje de fibras oxidativas y glucolíticas.

6.7.2. Determinación del fenotipo de las fibras mediante la histoquímica ATPasa básica pH 9.4

En la laminilla consecutiva de cada músculo se realizó la histoquímica para ATPasa básica (pH, 9.4) con el fin de determinar el tipo de fibras que constituye cada músculo. Las laminillas de cada músculo fueron colocadas en una solución de pre-incubación (Tris-HCl 0.04 M, CaCl₂ 0.2 M) a un pH 9.4 durante 20 min a 37 °C; posteriormente se lavaron 15 veces con agua destilada para ser colocados en una solución de incubación a (Buffer Tris HCl/CaCl₂, ATP, pH 9.4) durante 60 min a 37 °C. Posterior a la incubación, las muestras se lavaron rápidamente 15 veces con agua destilada, seguido de una incubación durante 3 min en CaCl₂ al 2%, la solución fue retirada y enseguida se agregó una solución de CoCl₂ al 2% sin enjuagar entre ellas. Una vez transcurrido el tiempo, los cortes se lavaron 20 veces con agua destilada y se dejaron en (NH₄)₂SO₄ al 10% hasta que adquieran una coloración negra (aproximadamente 3 min). Los cortes teñidos se lavaron con alcoholes de concentraciones ascendentes (50, 60 y 80%) durante 1 min por cada concentración para su deshidratación. Se dejaron secar y se cubrieron con medio de montaje y un cubreobjetos.

Finalmente, las preparaciones se observaron en un microscopio de luz visible (Nikon DSRI1) y se fotografió la muestra completa por secciones con una cámara OLYMPUS CX31 (magnificación 20X). La reconstrucción del músculo se realizó utilizando el programa Photoshop CS4 para obtener la imagen completa del músculo y realizar el análisis cuantitativo en el programa FIJI (versión 1.45 para Mac). Finalmente, las fibras musculares se clasificaron dependiendo su color, siendo clasificadas las fibras de color gris/café como rápidas (tipo IIb), las de color negro como intermedias (tipo IIa/IIc) y las blancas como lentas (tipo I). Los datos obtenidos se reportaron como porcentaje de fibras.

6.8. Análisis de datos

El análisis estadístico se realizó tomando como variable independiente el protocolo de inmovilización y como variables dependientes las características que comprenden el ciclo de zancada, las características histológicas y las características histoquímicas de las fibras de los músculos sóleo y EDL. Todos los datos fueron sometidos a una prueba de normalidad D'angostino-Pearson y Kolmogorov-Smirnov para probar que los datos fueran paramétricos. Respecto al análisis del ciclo de zancada, el análisis de la apertura máxima y mínima de los ángulos, el desplazamiento angular, la longitud, velocidad y duración del ciclo de zancada se realizaron utilizando las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov, para determinar las diferencias entre los grupos, se realizó una *t de Student* pareada. Para el análisis de los núcleos periféricos/fibra, núcleos centrales/fibra, CSA, distribución de fibras por rangos del área transversal y DMN las diferencias entre los grupos se determinaron realizando una *t de Student* para muestras paramétricas y una *U-Mann Whitney* para las no paramétricas, se usó $P < 0.05$ para indicar diferencias significativas. Para las histoquímicas NAH-TR y ATPasa básica pH 9.4 se realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov, lo que nos ayudó a determinar si los datos eran normales. Una vez verificado esto se utilizó una ANOVA de dos vías para determinar las diferencias entre los grupos. En todos los casos se usó el programa de análisis estadístico PRISM® (versión 6.0 c). Se consideraron diferencias significativas $P < 0.05$. Los datos muestran media \pm error estándar.

7. RESULTADOS

7.1. Parámetros morfométricos

La tabla 1 muestra los parámetros morfométricos analizados en las ratas y los músculos obtenidos de los grupos control (C, n=6) e inmovilizadas (I, n=3) de la extremidad ipsilateral. Se encontraron cambios significativos en la disminución del peso total del músculo EDL (C, 0.52 ± 0.1 vs I, 0.97 , $P=0.041$) y el ancho del músculo EDL (C, 5.1 ± 0.4 vs I, 3.3 ± 0.2 , $P=0.011$) entre el grupo control e inmovilizado.

TABLA 1. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DEL GRUPO CONTROL E INMOVILIZADO. Ratas hembra control (C); ratas inmovilizadas por un periodo de 7 días (I). (C, n=6; I, n=3).

	Peso (g)				Sóleo (mm)		EDL (mm)	
	7DA	7DD	Sóleo	EDL	Largo	Ancho	Largo	Ancho
C n=6	234.3±13.9	232.6±11.4	0.24±0.1	0.52±0.1	20.5±1.4	5.6±0.5	23.8±1.2	5.1±0.4
I n=3	233.3±12.1	223.7±10.9	0.1±0.001	0.97±0.02*	20.3±0.2	4.5±0.5	22.8±1.4	3.3±0.2*
Delta			-0.13±0.1	-0.42±0.1	-1.15±0.78	-1.8±0.5	-0.3±1.45	-1.0±1.9

Los datos muestran la media \pm error estándar. Se realizó la prueba *t de Student* no pareada. * $P < 0.05$.

7.2. Citología vaginal

Los resultados de la citología vaginal se indican en la tabla 2. Podemos observar que el 83.3% de los animales de ambos grupos se encontraban en la etapa de diestro. Etapa en la que conforme a la literatura que se usó como referencia para la determinación de la fase del ciclo (Macordés y cols. 2002; Paccola y cols. 2013) la concentración de estrógenos se encuentra en una menor concentración en comparación con el pro-estro y el estro.

TABLA 2. CITOLOGÍA VAGINAL DEL GRUPO CONTROL E INMOVILIZADO. Se muestra la fase del ciclo estral en la que se encontraban las ratas hembra el día de su disección tanto para el grupo control como el grupo inmovilizado. (C=6; I=6).

Control		Inmovilizado	
(C, n= 6)		(I, n= 6)	
ID	Fase	ID	Fase
1	Diestro	6	Diestro
2	Diestro	8	Diestro
3	Estro	9	Diestro
4	Diestro	10	Estro
5	Diestro	11	Diestro
11	Diestro	12	Diestro

7.3 Análisis de la locomoción

Dentro del análisis de la locomoción se realizó el análisis de los parámetros y componentes de la zancada para cada uno de los individuos del grupo I en ambas extremidades (ipsilateral y contralateral) siete días antes de la inmovilización (7DA) y siete días después (7DD). Se analizó el ciclo de zancada, los cambios de ángulo y movimiento de las articulaciones de la cadera, rodilla, tobillo y movimiento tipo péndulo de ambas extremidades. Los resultados descriptivos se muestran a continuación, los resultados cuantitativos se encuentran en la sección 7.3.1 y 7.3.2. En el grupo C los ciclos de las zancadas de ambas extremidades se presentaron de manera secuencial, organizada y coordinada. Así mismo, los ángulos de apertura de la cadera, rodilla y tobillo mostraron un ángulo de apertura normal en ambas extremidades y un cambio angular tipo péndulo organizado (Fig. 8). Cabe recordar que el análisis de la locomoción en el grupo C se realizó para hacer la comparación cualitativa con el grupo I 7DA de la inmovilización, el cual fungió como su propio control.

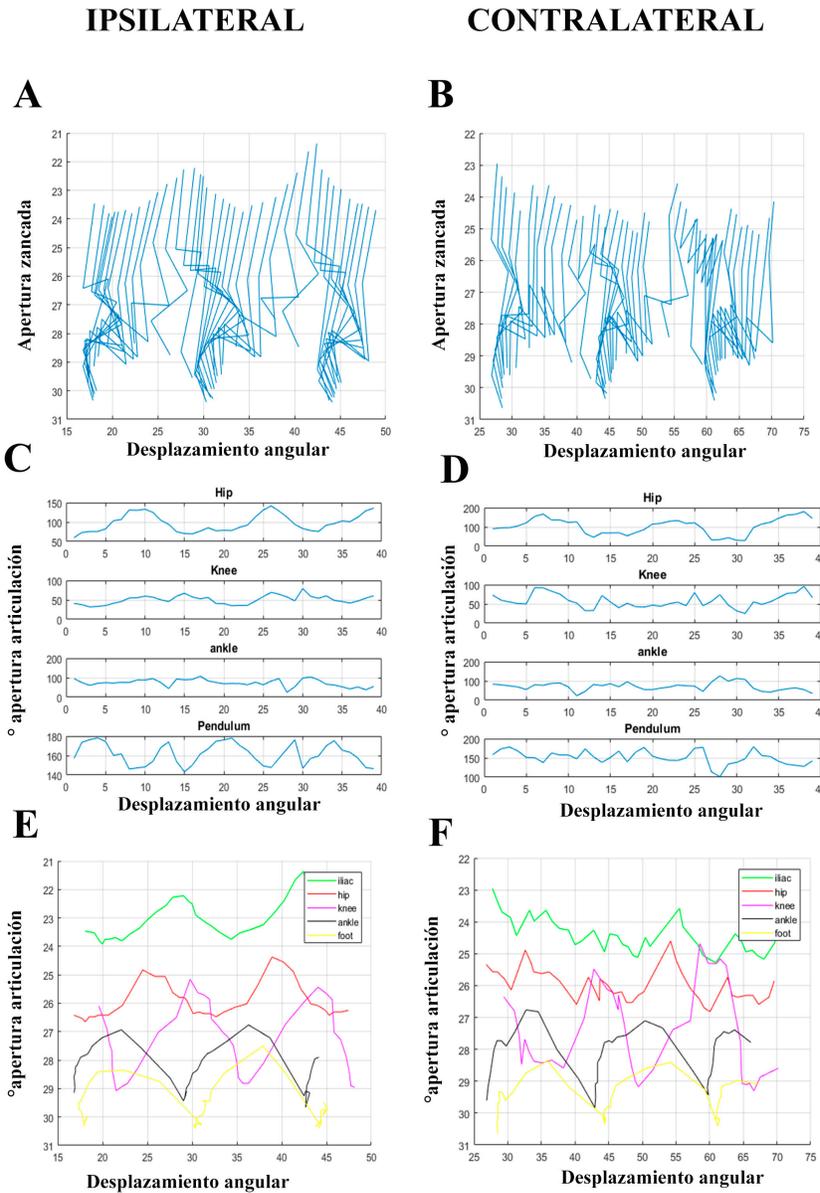


Figura 8. Análisis del ciclo de zancada grupo control (C) ipsilateral y contralateral Rata #1. A, B, patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

Para el grupo I 7DA a la inmovilización los ciclos de las zancadas de ambas extremidades se presentaron de manera secuencial, organizada y coordinada, al igual que el grupo C. Así mismo, los ángulos de apertura de la cadera, rodilla y tobillo mostraron un ángulo de apertura normal en ambas extremidades y un cambio angular tipo péndulo organizado (Fig. 9).

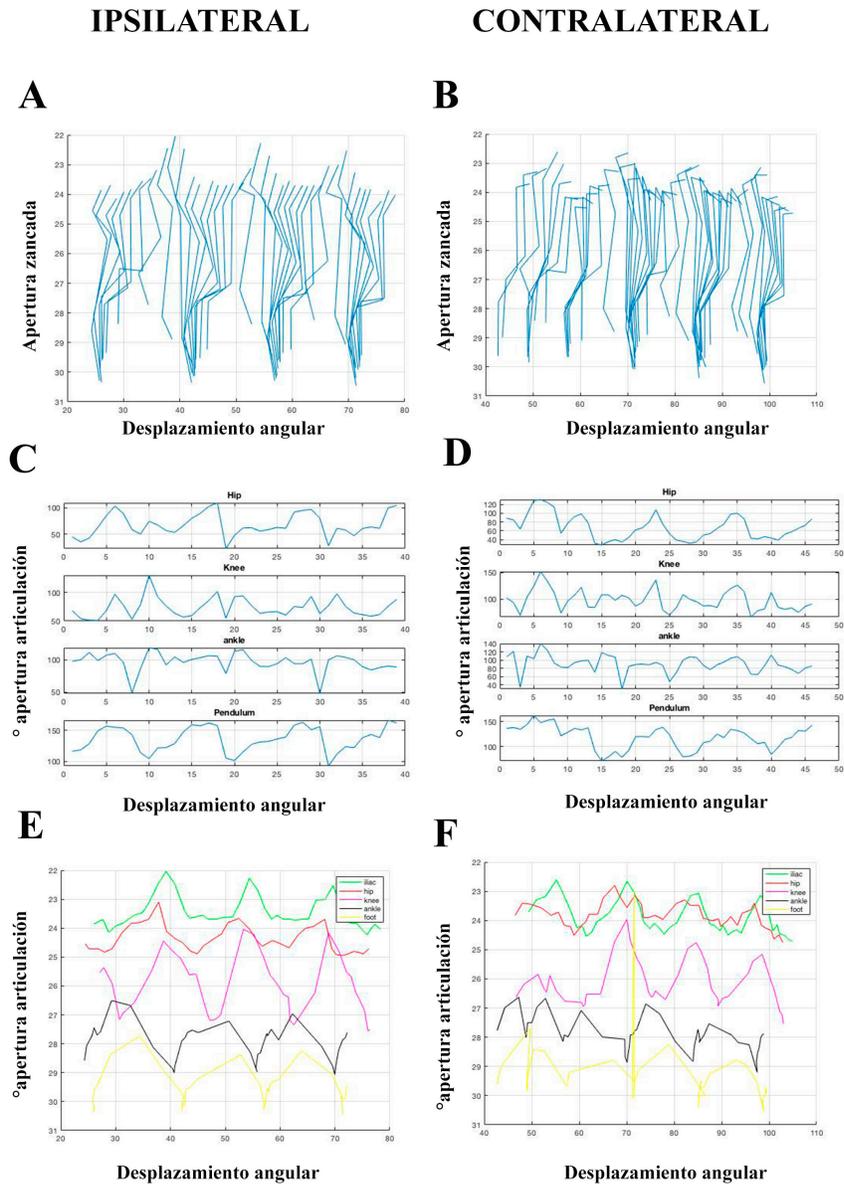


Figura 9. Análisis del ciclo de zancada grupo I ipsilateral y contralateral 7DA de la inmovilización Rata #6. A, B, patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

Para el grupo I 7DD a la inmovilización, los ciclos de zancada de ambas extremidades se presentaron desorganizados y asimétricos en comparación con el grupo I 7DA. Sin embargo, no se encontraron diferencias evidentes en los componentes del patrón locomotor. Sólo el ángulo de apertura de la cadera presentó alteraciones en la extremidad contralateral(Fig. 10).

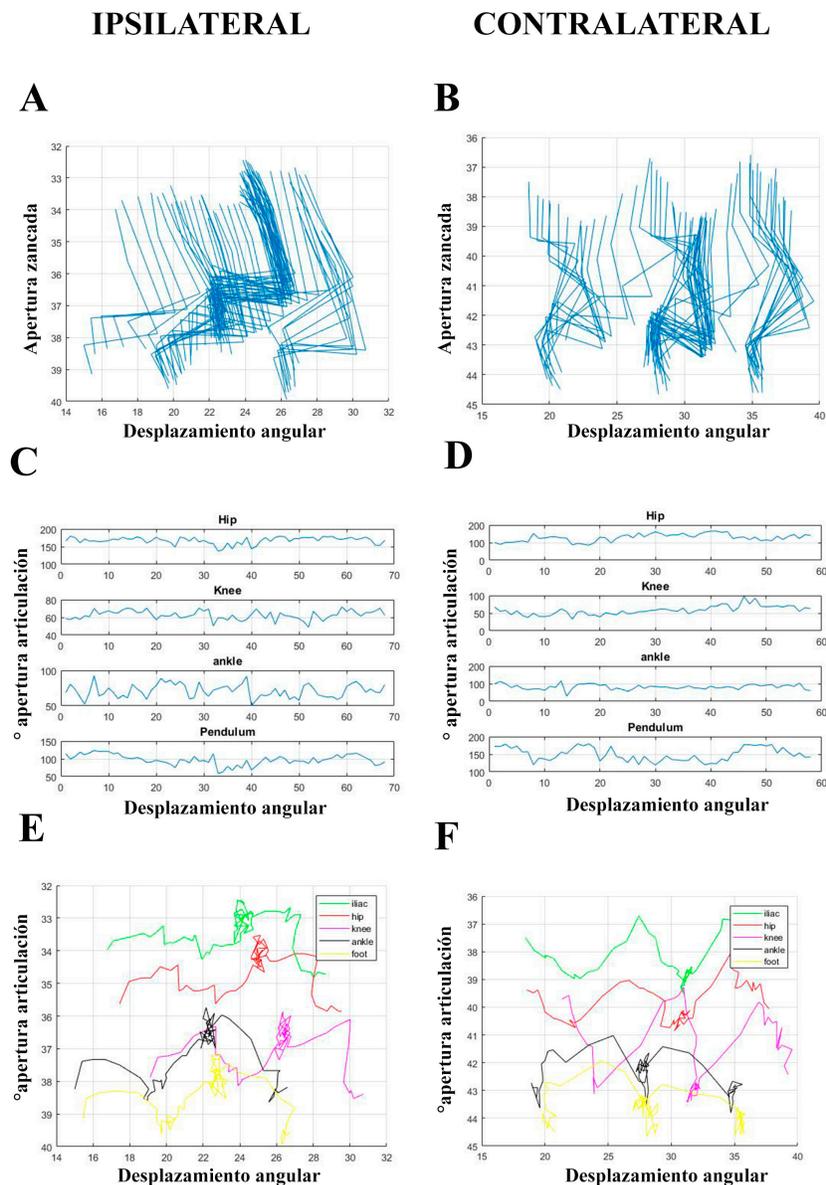


Figura 10. Análisis del ciclo de zancada del grupo I ipsilateral y contralateral 7 días después (7DD) de la inmovilización Rata #6. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, el movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

7.3.1. Análisis de ángulos máximos (extensión) y mínimos (flexión) de las articulaciones en el ciclo de zancada y desplazamiento angular

Se realizó el análisis de los ángulos máximos de extensión y mínimos de flexión de la cadera, rodilla, tobillo y el movimiento tipo péndulo para cada uno de los individuos del grupo I en ambas extremidades. El grupo C se usó únicamente como referencia para señalar las similitudes en los ángulos máximos y mínimos entre los grupos C e I 7DA, puesto que el grupo I 7DA es su propio control para los análisis con 7DD. NOTA: Esto aplica para todos los análisis métricos de los parámetros del ciclo de zancada.

Los resultados cualitativos mostraron diferencias significativas en el ángulo máximo de las articulaciones de la cadera determinados durante la mayor extensión de la extremidad contralateral 7DD de la inmovilización (7DA 48.85 ± 6.72 vs 7DD 80 ± 14.45 , $P=0.033$), mientras que en el ángulo máximo de las articulaciones de la rodilla, tobillo y movimiento tipo péndulo no se presentaron diferencias significativas en los ángulos máximos de extensión de los animales (rodilla: 7DA 50.08 ± 7.68 vs 7DD 59.21 ± 11.37 , $P=0.318$; tobillo: 7DA 51.87 ± 7.58 vs 7DD 62.06 ± 13.66 , $P=0.468$ y el movimiento tipo péndulo: 7DA 101.8 ± 4.40 vs 7DD 128.2 ± 9.03 , $P=0.055$) (Fig. 12 B, D, F, H).

El análisis del ángulo máximo de las articulaciones durante la extensión mayor de la extremidad ipsilateral 7DD de la inmovilización no mostraron diferencias significativas en las articulaciones de la cadera, rodilla, tobillo y movimiento tipo péndulo (cadera: 7DA, 127.1 ± 17.33 vs 7DD, 151.8 ± 12.34 , $P=0.26$; rodilla: 7DA 90.56 ± 14.74 vs 7DD 95.34 ± 11.92 , $P=0.715$; tobillo: 7DA 119.8 ± 8.72 vs 7DD 118.3 ± 13.05 , $P=0.892$ y el movimiento tipo péndulo: 7DA, 151.3 ± 5.96 vs 7DD, 154.7 ± 12.24 , $P=0.800$) (Fig. 12 A, C, E, G).

Lo mismo sucedió para el ángulo mínimo de las articulaciones durante la flexión de la extremidad ipsilateral 7DD de la inmovilización (cadera: 7DA, 65.59 ± 17.66 vs 7DD, 92.73 ± 19.25 , $P=0.437$; rodilla: 7DA, 46.76 ± 9.67 vs 7DD, 49.02 ± 5.24 , $P=0.687$; tobillo 7DA, 55.06 ± 11.48 vs 7DD, 59.91 ± 4.172 , $P=0.607$ y en el movimiento tipo péndulo: 7DA, 106.8 ± 15.93 vs 7DD, 108 ± 15.07 , $P=0.956$) (Fig. 11 A, C, E, G); ni en los ángulos mínimos de las articulaciones determinados durante la flexión de la extremidad contralateral 7DD de los animales (cadera: 7DA, 48.85 ± 6.72 vs 7DD, 80 ± 14.45 , $P=0.079$; rodilla: 7DA, 50.08 ± 7.68 vs 7DD, 59.21 ± 11.37 , $P=0.52$; tobillo: 7DA, 51.87 ± 7.58 vs 7DD, 62.06 ± 13.66 , $P=0.468$ y en el

movimiento tipo péndulo: 7DA, 101.8 ± 4.40 vs 7DD, 128.2 ± 9.03 , $P=0.055$) (Fig. 11 B, D, F, H).

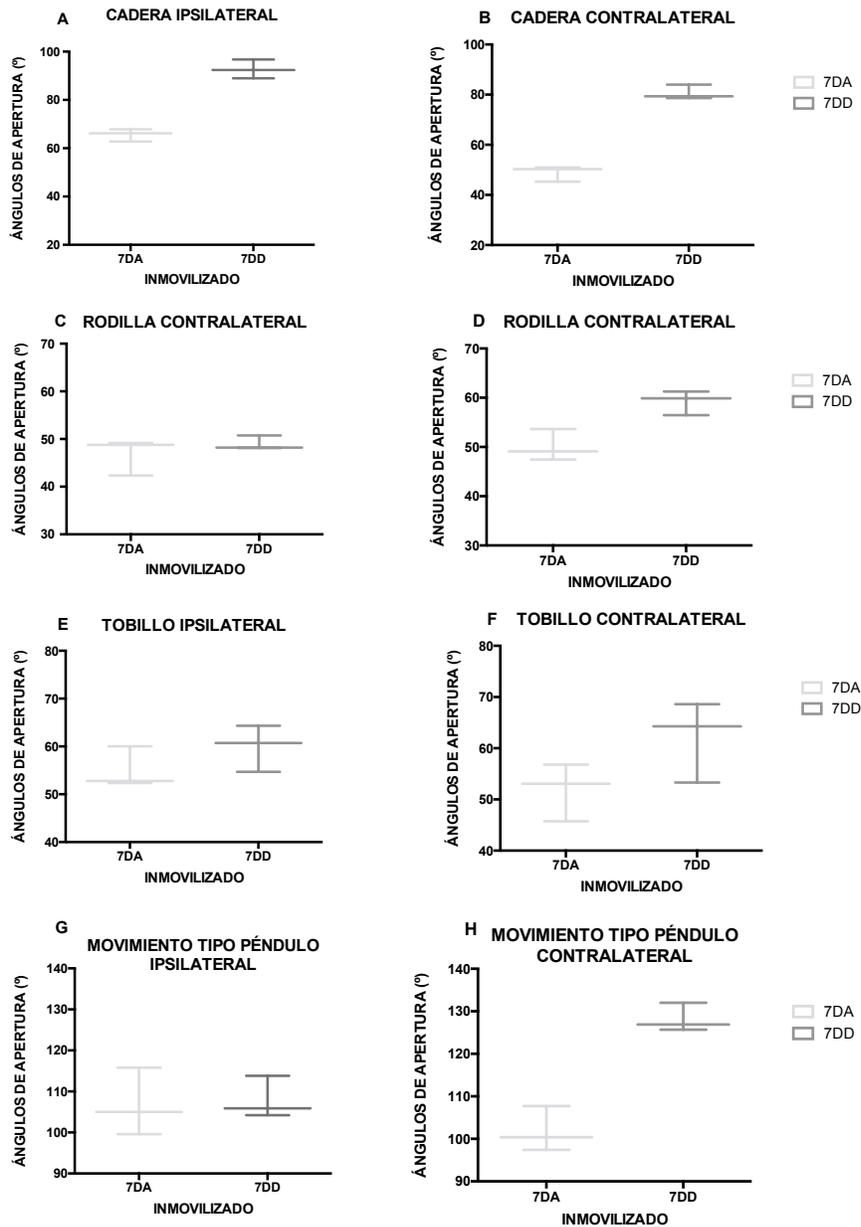


Figura 11. Análisis de los ángulos de apertura mínimos de la extremidad ipsi- y contralateral del grupo I 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) de la inmovilización. A, B, cadera 7DA vs 7DD; C, D, rodilla 7DA vs 7DD; E, F, tobillo 7DA vs 7DD; G, H, movimiento tipo péndulo 7DA vs 7DD de las extremidades ipsi- y contralateral. Los datos representan la media y los cuartiles de la distribución de los datos. 7DA, cajas gris claro y 7DD, cajas gris oscuro (n=6). *t de Student*. * $P < 0.05$.

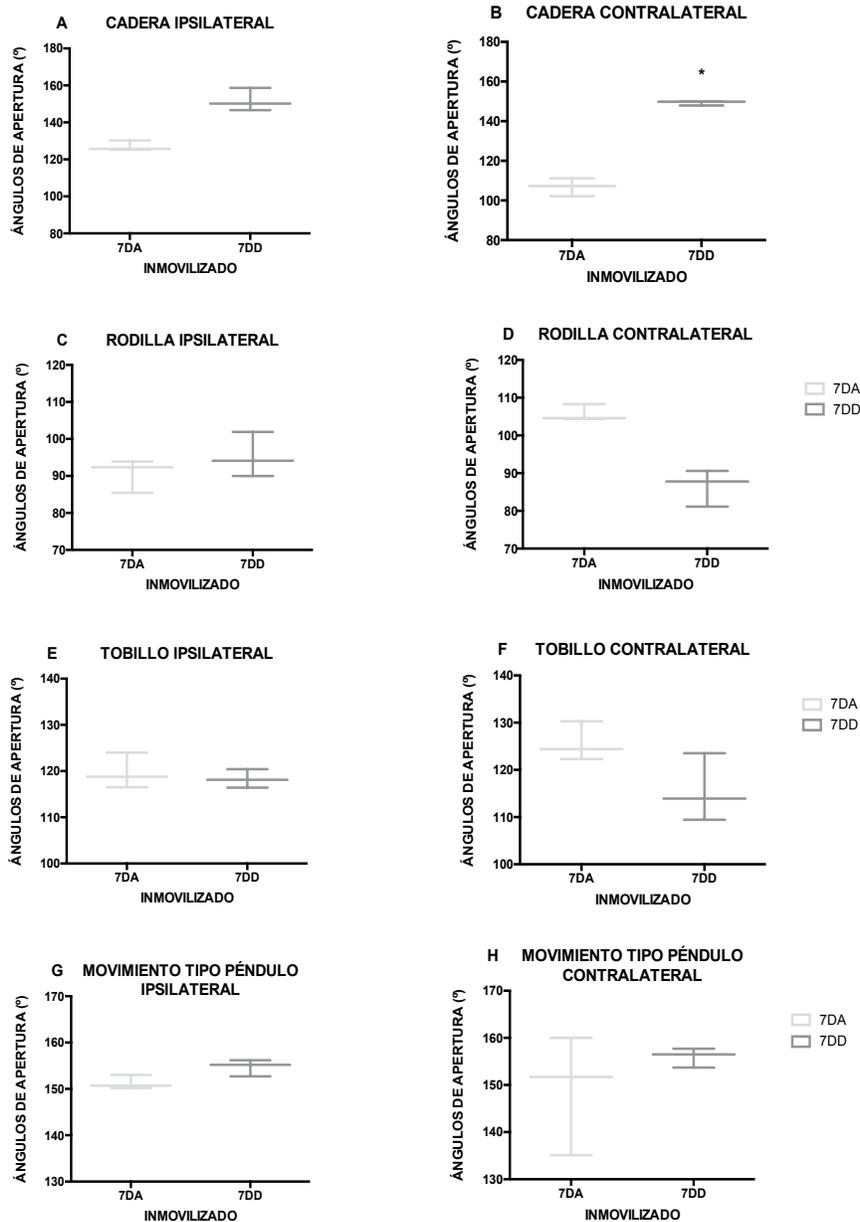


Figura 12. Análisis de los ángulos de apertura máximos de la extremidad ipsi- y contralateral del grupo I 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) de la inmovilización. A, B, cadera 7DA vs 7DD; C, D, rodilla 7DA vs 7DD; E, F, tobillo 7DA vs 7DD; G, H, movimiento tipo péndulo 7DA vs 7DD de las extremidades ipsi- y contralateral. Los datos representan la media y los cuartiles de la distribución de los datos. 7DA, cajas gris claro y 7DD, cajas gris oscuro (n=6). *t de Student*. * $P < 0.05$.

Así mismo, se realizó el análisis del desplazamiento angular de la cadera, rodilla, tobillo y el movimiento tipo péndulo para cada uno de los individuos del grupo en ambas extremidades. No se encontraron diferencias significativas en el desplazamiento angular de la extremidad ipsilateral 7DA (cadera: 7DA, 61.5 ± 6.41 vs 7DD, 59.09 ± 9.003 , $P=0.876$, rodilla: 7DA, 43.79 ± 5.191 vs 7DD, 46.32 , $P=0.758$, tobillo: 7DA, 64.7 ± 6.24 vs 7DD, 58.35 ± 10.74 , $P=0.807$ y movimiento tipo péndulo: 7DA, 44.51 ± 18.32 vs 7DD, 46.77 ± 10.01 , $P=0.995$) (Fig. 13 A, C, E, G); ni en el desplazamiento angular de la extremidad contralateral 7DD (cadera: 7DA, 58 ± 8.7 vs 7DD, 68.56 ± 10.5 , $P=0.578$, rodilla: 7DA, 55.68 ± 8.45 vs 7DD, 27.31 ± 18.84 , $P=0.254$, tobillo: 7DA, 73.78 ± 2.068 vs 7DD, 53.55 ± 13.94 , $P=0.241$ y movimiento tipo péndulo: 7DA, 47.08 ± 8.36 vs 7DD, 27.78 ± 17.22 , $P=0.378$) (Fig. 13 B, D, F, H).

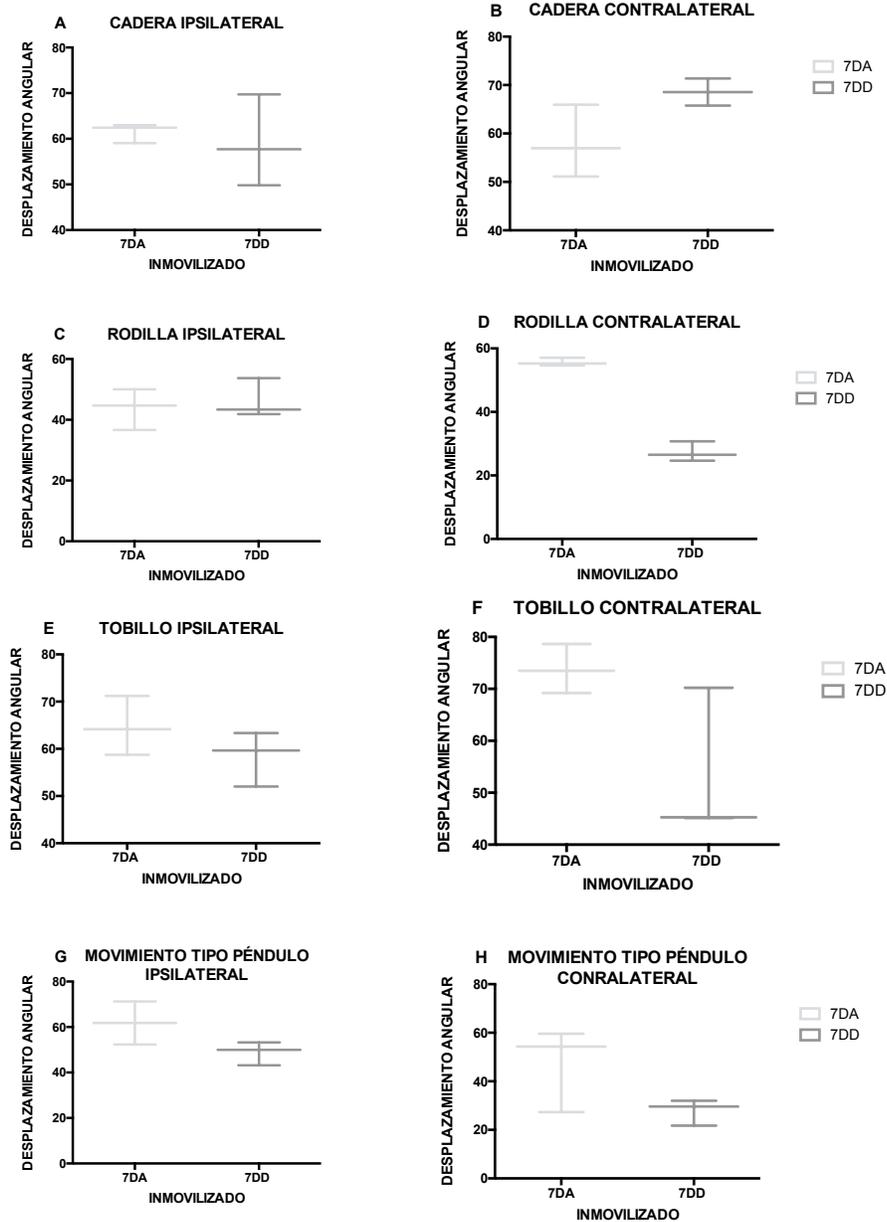


Figura 13. Análisis del desplazamiento angular de la extremidad ipsi- y contralateral del grupo I 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) de la inmovilización . A, B, cadera 7DA vs 7DD; C, D, rodilla 7DA vs 7DD; E, F, tobillo 7DA vs 7DD; G, H, movimiento tipo péndulo 7DA vs 7DD de las extremidades ipsi- y contralateral. Los datos representan la media y los cuartiles de la distribución de los datos. 7DA, cajas gris claro y 7DD, cajas gris oscuro (n=6). *t* de Student. * $P < 0.05$.

7.3.2. Cálculo de longitud, duración y velocidad del ciclo de zancada

Se realizó el análisis de la longitud del ciclo de zancada para cada uno de los individuos del grupo C e I en ambas extremidades. El grupo C se usó únicamente como referencia para señalar las similitudes en la longitud de la zancada entre los grupos C e I 7DA, puesto que el grupo I 7DA es su propio control para los análisis con 7DD.

La longitud de la zancada de la extremidad ipsilateral presentó una disminución significativa entre 7DA y 7DD de la inmovilización (7DA, 9.61 ± 0.93 vs 7DD, 5.18 ± 1.15 ; $P=0.014$) (Fig. 14 B). No se encontraron diferencias significativas en la longitud de la extremidad contralateral entre 7DA y 7DD de la inmovilización (7DA, 9.95 ± 0.76 vs 7DD, 7.99 ± 0.58 ; $P=0.069$) (Fig. 14 C).

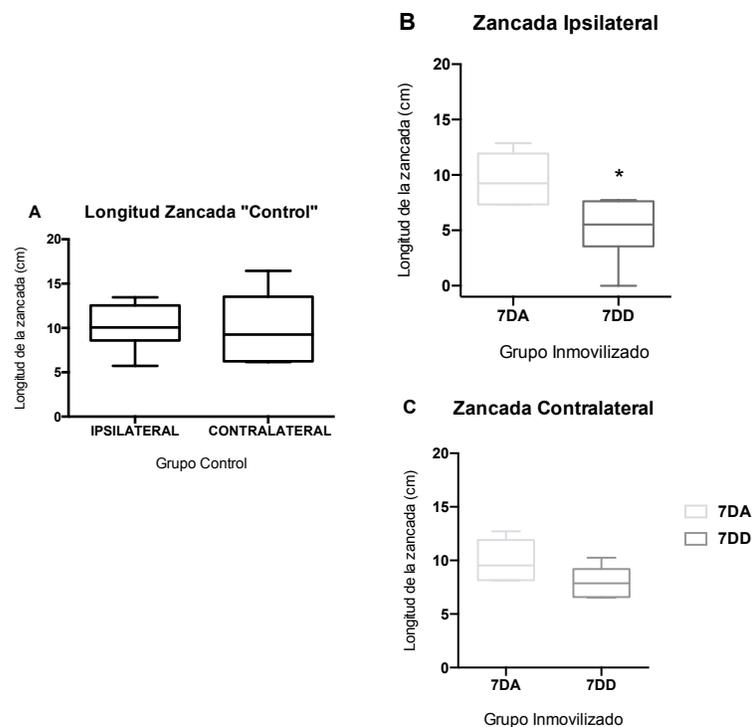


Figura 14. Análisis de la longitud de la zancada ipsilateral y contralateral del grupo C e I 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) de la inmovilización. A, zancada ipsi- y contralateral del grupo C; B, zancada ipsilateral 7DA vs 7DD del grupo I; y C, zancada contralateral 7DA vs 7DD del grupo I. Los datos representan la media y los cuartiles de la distribución de los datos. C, cajas negras, 7DA, cajas gris claro y 7DD, cajas gris oscuro (n=6). *t de Student*. * $P < 0.05$.

En el análisis de la duración de la zancada, el grupo C se usó únicamente como referencia para señalar las similitudes en la duración de la zancada entre los grupos C e I 7DA, puesto que el grupo I 7DA es su propio control para el análisis contra 7DD (Tabla 3).

Para la extremidad contralateral la duración de la zancada disminuyó significativamente entre 7DA Y 7DD del grupo inmovilizado (7DA, 0.23 ± 0.2 vs 7DD, 0.39 ± 0.06 ; $P=0.048$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la duración de la zancada de la extremidad ipsilateral entre 7DA y 7DD de la inmovilización (7DA, 0.21 ± 0.02 vs 7DD, 0.23 ± 0.2 ; $P=0.351$) (Tabla 3).

TABLA 3. DURACIÓN DE LA ZANCADA GRUPO CONTROL E INMOVILIZADO 7DA Y 7DD DE LA EXTREMIDAD IPSILATERAL Y CONTRALATERAL. Se muestra la media \pm ee de la duración de la zancada en segundos del grupo control e inmovilizado 7DA y 7DD en la extremidad ipsilateral y contralateral del grupo inmovilizado (n=6).

Ipsilateral	Duración zancada (seg)
Control	0.21 ± 0.01
Inmovilizado 7DA	0.21 ± 0.02
Inmovilizado 7DD	0.33 ± 0.11
Contralateral	Duración zancada (seg)
Control	0.37 ± 0.15
Inmovilizado 7DA	0.23 ± 0.2
Inmovilizado 7DD	$0.39 \pm 0.06^*$

Se realizó la prueba *t de Student*. *muestran diferencias significativas. $P < 0.05$.

La velocidad de la zancada en la extremidad ipsilateral disminuyó significativamente 7DD de la inmovilización (7DA, 51.34 ± 10.41 vs 7DD, 10.52 ± 4.37 ; $P= 0.009$) (Fig. 15 B). Lo mismo en la extremidad contralateral (7DA, 45.05 ± 4.93 vs 7DD, 24.37 ± 4.63 , $P=0.012$) (Fig. 15 C).

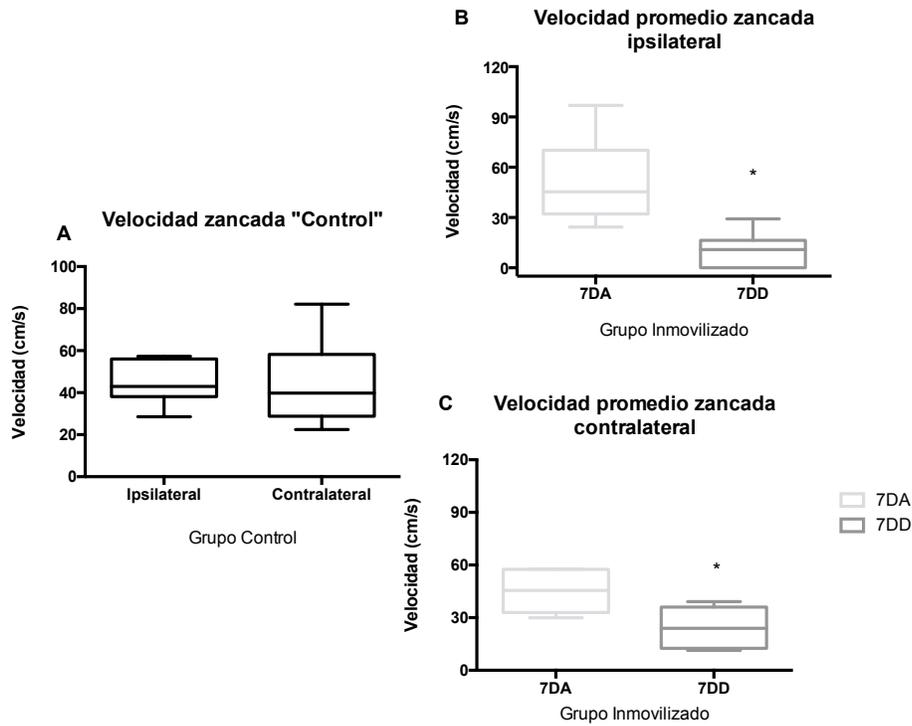


Figura 15. Análisis de la velocidad de la zancada ipsilateral y contralateral del grupo C e I 7 días antes (7DA) y 7 días después (7DD) de la inmovilización. A, zancada ipsi- y contralateral del grupo C; B, zancada ipsilateral 7DA vs 7DD del grupo I; y C, zancada contralateral 7DA vs 7DD del grupo I. Los datos representan la media y los cuartiles de la distribución de los datos. C, cajas negras, 7DA, cajas gris claro y 7DD, cajas gris oscuro (n=6). *t de Student*. * $P < 0.05$.

7.4. Análisis histológico del músculo sóleo y Extensor digitorum longus (EDL) con la tinción de H-E

Cualitativamente las fibras del músculo sóleo son más pequeñas en comparación con las fibras del músculo EDL, independientemente de la condición (Fig. 16).

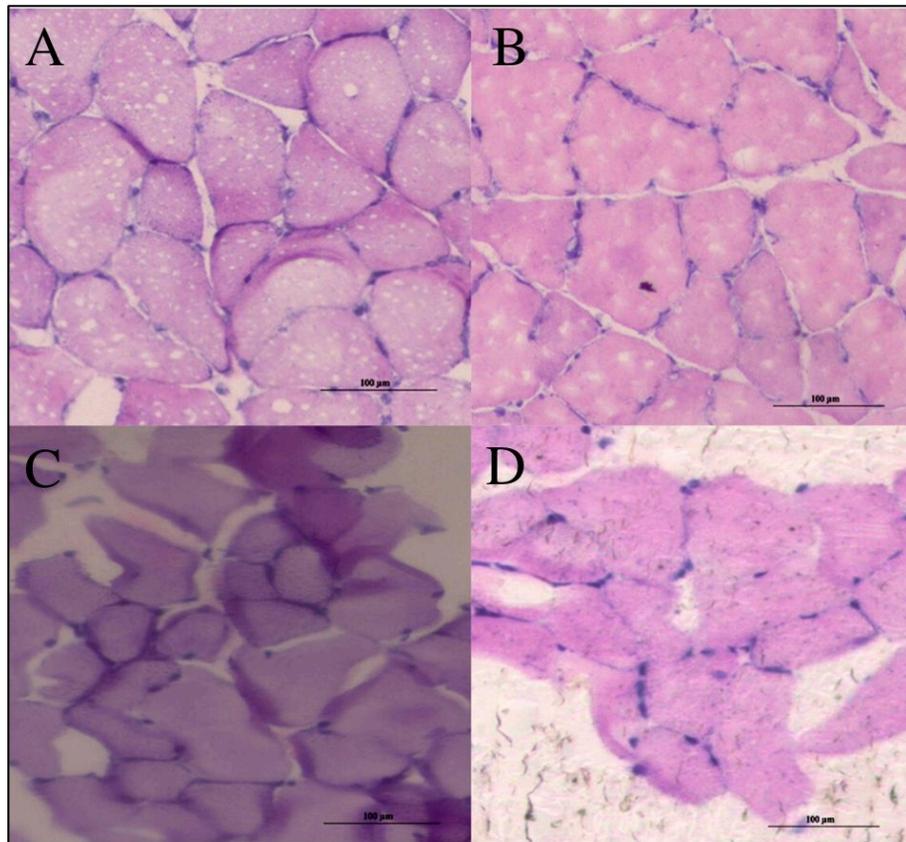


Figura 16. Características histológicas de los músculos sóleo y EDL. A, músculo sóleo grupo control; B, músculo sóleo grupo inmovilizado; C, músculo EDL grupo control y, D músculo EDL grupo inmovilizado. Cortes transversales de 10 µm de espesor teñidos con H-E. Barra 100 µm.

7.4.1. Núcleos periféricos y centrales de las fibras musculares

No se encontraron diferencias significativas en número de núcleos periféricos entre el grupo C e I del músculo sóleo (C, 3.0 ± 0.2 vs. I, 3.5 ± 0.5 ; $P=0.999$) (Fig. 17 A). Para el músculo EDL tampoco se encontraron diferencias significativas en el número de núcleos periféricos entre el grupo C e I (C, 2.0 ± 0.16 vs I, 2.0 ; $P=0.656$) (Fig. 17 B).

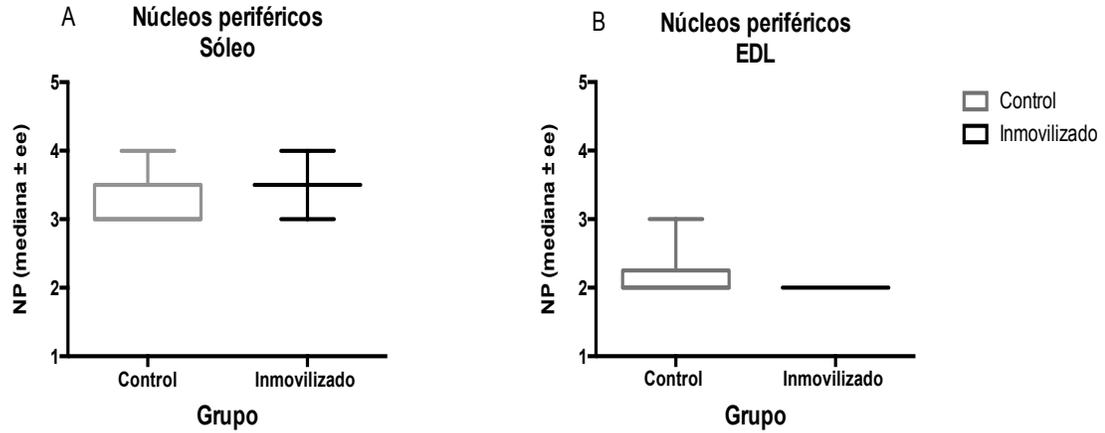


Figura 17. Efecto de la inmovilización muscular sobre la cantidad de núcleos periféricos en las fibras musculares de los músculos sóleo y EDL. A, músculo sóleo; B, músculo EDL. Los datos representan la mediana del número de núcleos periféricos de 35 fibras musculares analizadas por rata y los cuartiles de la distribución de dichos datos (C, n=6; I, n=3). Se realizó la prueba *t de Student*. $P < 0.05$.

Respecto al número de núcleos centrales, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para el músculo sóleo (C, 0 vs I, 0; $P=0.999$) (Fig. 18 A). Lo mismo sucedió en el músculo EDL (C, $0.4 \pm .4$ vs I, 0; $P=0.379$) (Fig. 18 B).

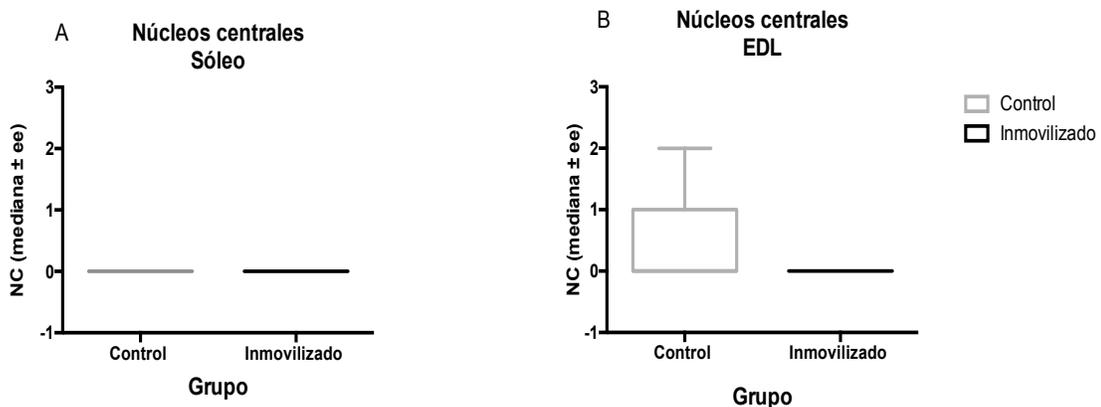


Figura 18. Efecto de la inmovilización muscular sobre la cantidad de núcleos centrales en las fibras musculares de los músculo sóleo y EDL. A, músculo sóleo; B, músculo EDL. Los datos representan la mediana del número de núcleos periféricos de 35 fibras musculares analizadas por rata y los cuartiles de la distribución de dichos datos (C, n=6; I, n=3). Se realizó la prueba *t de Student*. $P < 0.05$.

7.4.2. Área transversal de las fibras (CSA)

El área transversal de las fibras del músculo sóleo del grupo I fue significativamente menor que las del grupo C (C, $482.4 \pm 15.03 \mu\text{m}^2$ vs I, $399.8 \pm 7.9 \mu\text{m}^2$; $P=0.046$) (Fig. 11 A). En el músculo EDL no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (C, $482.4 \pm 15.03 \mu\text{m}^2$ vs I, $399.8 \pm 7.9 \mu\text{m}^2$; $P=0.046$) (Fig. 19 B).

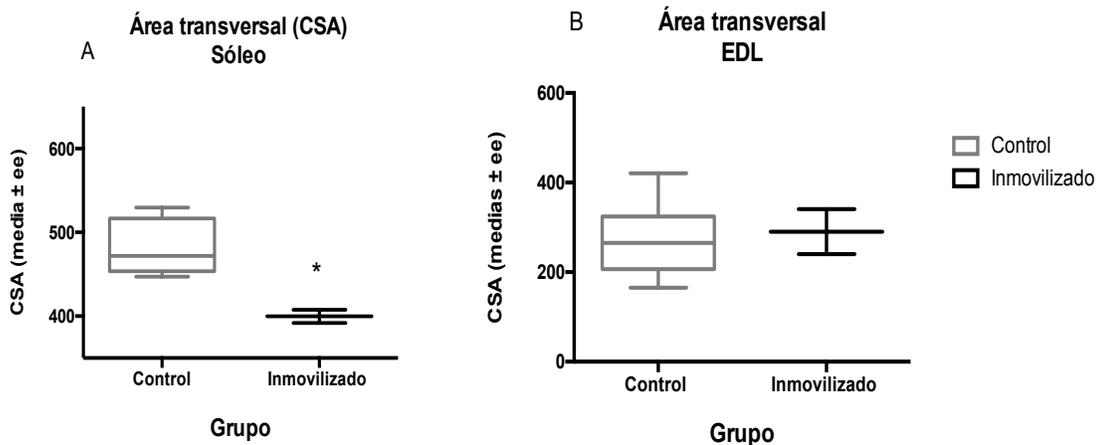


Figura 19. Efecto de la inmovilización muscular sobre el CSA de los músculos sóleo y EDL. A, músculo sóleo; B, músculo EDL. Los datos representan la mediana del número del área transversal de la fibra de 35 fibras musculares analizadas por rata y los cuartiles de la distribución de dichos datos (C, n=6; I, n=3). Se realizó la prueba *t de Student*. *diferencias significativas. $P<0.05$.

7.4.4. Distribución de fibras por rangos de área transversal.

La distribución del área transversal de las fibras por rangos en el músculo sóleo presentaron una distribución más acotada y en rangos de áreas menores para el grupo I (C, $482.44 \mu\text{m}^2$ vs I, $400 \mu\text{m}^2$) (Fig. 20 A). De igual manera, en el músculo EDL se presentó una reducción en la distribución de las fibras por rangos del área transversal en el grupo I en comparación con el grupo C (C, $271 \mu\text{m}^2$ vs I, $291 \mu\text{m}^2$) (Fig. 20 B).

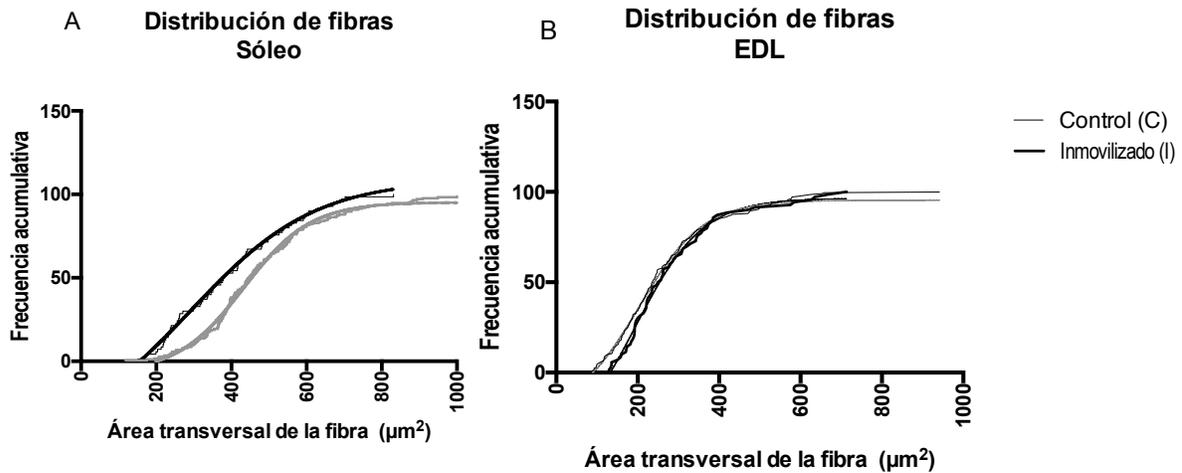


Figura 20. Efecto de la inmovilización muscular sobre la distribución por rangos de área de las fibras de los músculos sóleo y EDL. Los datos representan la frecuencia acumulativa de fibras. A, músculo sóleo; y B, músculo EDL. Los datos representan la frecuencia acumulativa de 35 fibras musculares analizadas por rata (C, n=6; I, n=3).

7.4.4. Dominio mionuclear (DMN)

El análisis del DMN, nos ofrece información sobre la demanda metabólica de las fibras musculares en una determinada ventana de tiempo. En este caso, el músculo sóleo presentó una disminución significativa después del periodo de inmovilización (C, 176.4 ± 12.61 vs I, 111.05 ± 1.15 ; $P=0.006$) (Fig. 21 A). Mientras que para el músculo EDL, no se presentaron diferencias significativas entre los grupos (C, 149.38 ± 13.11 vs I, 155 ± 8.2 ; $P=0.999$) (Fig. 21 B).

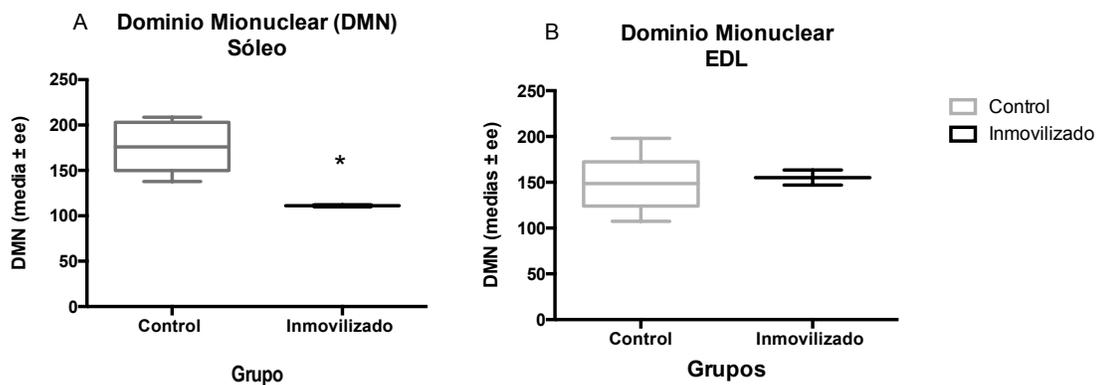


Figura 21. Efecto de la inmovilización muscular sobre el dominio mionuclear (DMN) sobre los músculos sóleo y EDL. A, músculo sóleo; B, músculo EDL. Los datos representan la mediana del dominio mionuclear de 35 fibras musculares analizadas por rata y los cuartiles de la distribución de dichos datos (C, n=6; I, n=3). Se realizó la prueba *t de Student*. *diferencias significativas. $P < 0.05$.

7.5. Características histoquímicas de los músculos sóleo y extensor digitorum longus (EDL)

7.5.1. Determinación del metabolismo de fibras mediante la histoquímica de NADH-TR

Los cortes transversales fueron teñidos con la histoquímica NADH-TR, la cual nos permite identificar el porcentaje de fibras oxidativas en los músculos sóleo y EDL (Fig. 22) y por diferencia respecto al total de fibras oxidativas en cada uno, el porcentaje de fibras glucolíticas.

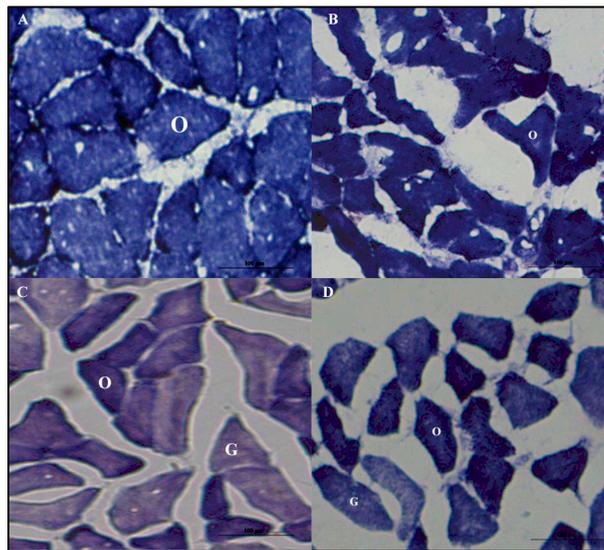


Figura 22. Microfotografías de histoquímica para NADH-TR en los músculos sóleo y EDL. A, músculo sóleo grupo C; B, músculo sóleo grupo I; C, músculo EDL grupo C; D, músculo EDL grupo I. O, oxidativas; G, glucolíticas. Corte transversal de 10µm. Barra de escala, 100µm.

Los resultados del porcentaje de fibras oxidativas y glucolíticas no mostraron diferencias significativas en el músculo sóleo entre los grupos C e I (O; C, 78.83 ± 7.58 vs I, 83.77 ± 1.998 , $P=0.672$; G; C, 22.33 ± 7.361 vs I, 16.15 ± 2.081 , $P=0.0.587$) (Fig. 23 A). Lo mismo sucedió para el músculo EDL (O; C, 78.83 ± 7.587 vs I, 83.77 ± 1.997 , $P=0.223$; G; C, 47.5 ± 3.845 vs I; 38 ± 6.65 ; $P=0.223$) (Fig. 23 B).

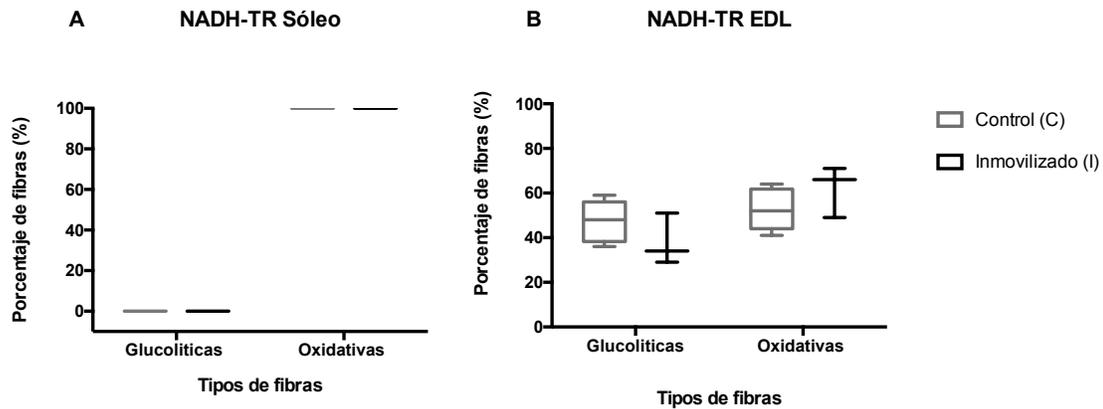


Figura 23. Efectos de la inmovilización muscular sobre el metabolismo de las fibras musculares de los músculos sóleo y EDL identificados con la histoquímica de NADH-TR. A, músculo sóleo y B, músculo EDL. Los datos representan el porcentaje de las fibras oxidativas y glucolíticas del grupo C vs I, se realizó la reconstrucción del músculo a partir de cortes transversales (10 μ m) (C, n=6; I, n=3) Se realizó la prueba *t de Student*. $P < 0.05$.

7.5.2. Determinación del fenotipo de las fibras mediante la histoquímica de ATPasa básica pH 9.4

La tinción histoquímica ATPasa básica, pH 9.4 en cortes del músculo sóleo y EDL nos ayudó a determinar la composición, en cuanto al porcentaje, de fibras de los tipos lento (Tipo I), intermedias (Tipo IIa/II_d) y rápidas (Tipo II) para los grupos C (Fig. 26 A, C) e I (Fig. 24 B, D).

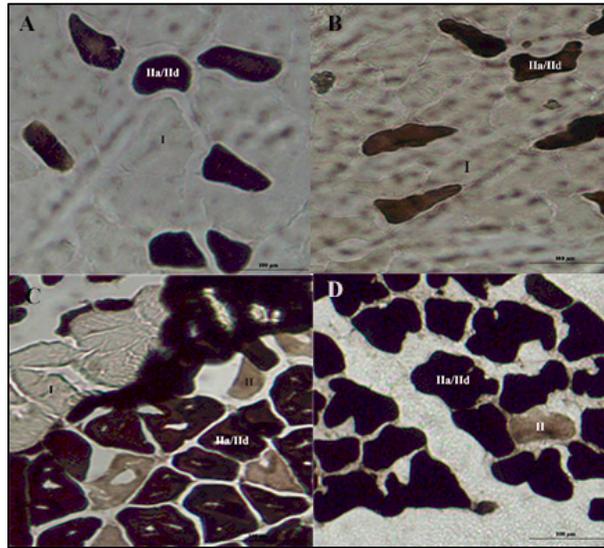


Figura 24. Microfotografías de histoquímica para ATPasa básica, pH 9.4 en los músculos sóleo y EDL. A, músculo sóleo grupo C; B, músculo sóleo grupo I; C, músculo EDL grupo C; D, músculo EDL grupo I. Las fibras blancas representan a las fibras lentas (Tipo I), las fibras negras a las intermedias (Tipo IIa/IIc) y las fibras grises a las rápidas (Tipo II). Corte transversal de 10µm. Barra de escala, 100µm.

El porcentaje de fibras de tipo I, IIa/IIc y II es similar entre los grupos C e I en el músculo sóleo (tipo I; C, 38.67 ± 16.54 vs I, 52.33 ± 25.3 , $P=0.655$; tipo IIa/IIc; C, 29 ± 11.89 vs I, 40 ± 17.69 , $P=0.615$; tipo II; C, 11 ± 7.768 vs 4 ± 0.577 , $P=0.246$) (Fig. 25 A).

Lo mismo sucedió para el músculo EDL (tipo I; C, 7.833 ± 2.509 vs I, 1.0 , $P=0.105$; tipo IIa/IIc; C, 81.33 ± 4.78 vs I, 95.33 ± 6.666 , $P=0.086$; tipo II; C, 11 ± 3.768 vs I, 4 ± 0.577 , $P=0.246$) (Fig. 25 B).

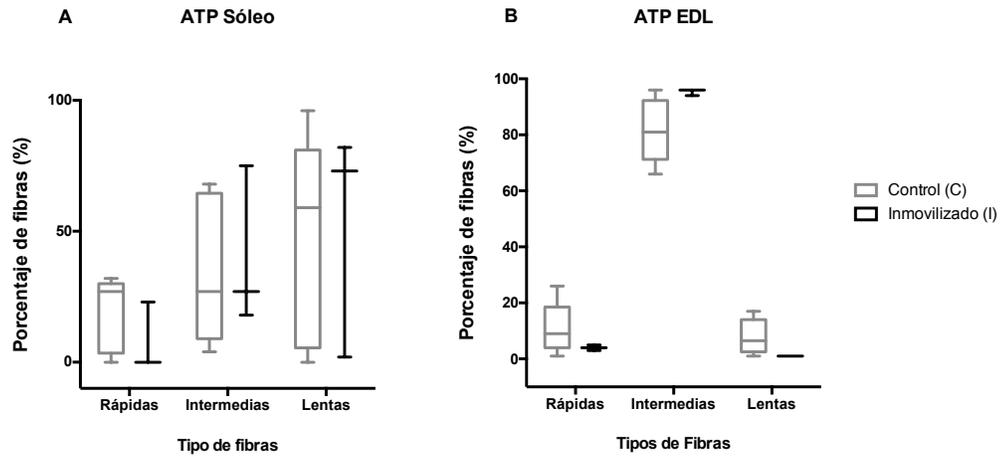


Figura 25. Efectos de la inmovilización muscular el fenotipo de las fibras musculares de los músculos sóleo y EDL identificados con la histoquímica para ATPasa básica (pH 9.4). A, músculo sóleo y B, músculo EDL. Los datos representan el porcentaje de fibras tipo I, tipo IIa/IIc y tipo II del grupo control vs inmovilizado analizados por rata, se realizó la reconstrucción del músculo a partir de cortes transversales (10µm) (C, n=6; I, n=3) Se realizó la prueba *t de Student* *muestra diferencias significativas. $P < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

Los resultados sobre los efectos de la inmovilización de la extremidad posterior derecha por 7 días mostraron alteraciones en los parámetros morfométricos del músculo EDL, mostrando una disminución en el peso y el ancho del músculo EDL mientras que el músculo sóleo no presentó alteraciones en los parámetros morfométricos. Así mismo, se encontraron modificaciones en el patrón locomotor, principalmente en la longitud y velocidad de la zancada de ambas extremidades (ipsilateral y contralateral) después de la inmovilización. Lo mismo sucedió para la duración de la zancada sólo en la extremidad contralateral.

Para las características histológicas, la inmovilización provocó una disminución en el CSA sólo en el músculo sóleo sin alterar el número de núcleos periféricos, lo que llevó a una disminución del DMN. Finalmente, la inmovilización por 7 días fue incapaz de provocar diferencias en el metabolismo y fenotipo de ambos músculos.

En el músculo sóleo no se presentaron diferencias significativas en el peso, largo y ancho del músculo, sin embargo, para el músculo EDL se presentaron diferencias en el peso y ancho del músculo. A pesar de no haber alteraciones en los parámetros morfométricos del músculo sóleo, se puede decir que el músculo EDL comienza a presentar alteraciones directas sobre el músculo esquelético inmovilizado. Se ha reportado que, además del tiempo de inmovilización, dependiendo de la posición del miembro inmovilizado y la posición en la que queden durante la inmovilización los músculos involucrados, serán los cambios histológicos presentes en estos. Dichos cambios pueden ser a nivel del número de sarcómeros, tipo de tejido conectivo y CSA (Coutinho y cols. 2002; Guertín 2011). Con lo anterior, podríamos sospechar que el músculo sóleo comienza a tener una disminución en el número de sarcómeros, asociando esto a la posición acortada en la que se mantiene durante el periodo de inmovilización y a los datos reportados por Järvinen y colaboradores (2002); Guo y colaboradores (2012), pero que por el poco tiempo de inmovilización no se presenta una alteración morfológica. Sin embargo, para corroborar directamente este dato sería conveniente realizar el análisis histológico apropiado utilizando cortes longitudinales del mismo y haciendo el conteo de sarcómeros por unidad de área, esto se puede asociar con la posición en la que se tuvo inmovilizado el músculo, a las

catepsinas y ubiquitinas que encontramos en el músculo después de una lesión, las cuales inducen a la degradación de proteínas musculares ante una lesión.

8.1. Efectos de la inmovilización en un periodo de 7 días sobre el ciclo de zancada

Para realizar un ciclo de zancada correcto, se requiere de la coordinación de las articulaciones de manera individual para poder producir la flexión y extensión de las extremidades, así como las dos fases del ciclo de zancada (soporte y balanceo) (Bucher y cols. 2015; Cárdenas-Hernández y Rodríguez-Sánchez 2007). En el presente trabajo hemos observado que el ciclo de zancada se ve alterado transcurrido el periodo de 7 días de la inmovilización tanto en la extremidad ipsilateral (inmovilizada) como en la contralateral. Para los grados mínimos de flexión y máximos de extensión de la articulación y desplazamiento angular no se presentaron cambios significativos, esto puede ser debido a que el tiempo de inmovilización es muy corto como para ocasionar daños a nivel articular, sin embargo, a pesar de no haber diferencias significativas, las extremidades pierden la fuerza para poder realizar un ciclo de zancada normal, esto debido al periodo de inmovilización, dicha información concuerda con lo ya antes mencionado por De la Torre-Valdovinos y cols. 2016, este tipo de alteraciones ocurren en consecuencia de la falta de movimiento de la extremidad durante un periodo prolongado ocasionando que se tenga una pérdida en la flexibilidad, fuerza y dureza de la extremidad (De la Torre-Valdovinos y cols. 2016).

Así mismo, los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo ya mencionado por Bucher y cols. 2015; Tuthill y Azim 2018 que, al no tener una retroalimentación propioceptiva, no se puede realizar un ciclo de zancada rápido o fluido ya que ambas extremidades se encuentran afectadas por la inmovilización (Butcher y cols. 2015; Tuthill y Azim 2018). La longitud y velocidad del ciclo de zancada se encuentran alteradas e incluso disminuidas debido a la falta de coordinación, fuerza y soporte de las articulaciones de ambas extremidades. Para la duración de la zancada, no se presentaron diferencias significativas en la extremidad ipsilateral mientras que, para la extremidad contralateral, se presentó una disminución. Las alteraciones en la longitud, velocidad y duración de la zancada para cada extremidad respectivamente, se puede asociar a que, durante el periodo de inmovilización, la

extremidad contralateral debía reponer el soporte, fuerza y movimiento que no obtenía de la extremidad ipsilateral, por lo cual debió de adaptar su zancada a dichos cambios. Esto concuerda con lo mencionado por Manca y cols. 2020, en su estudio demostraron que la extremidad contralateral también se ve afectada por la falta de movimiento de la extremidad ipsilateral. Además, reportan que, para tener una rehabilitación completa, es necesario realizar primero la rehabilitación en la extremidad contralateral. Una vez que esta haya fortalecido a los músculos débiles, se puede optar por realizar rehabilitación en la extremidad que estuvo lesionada y así recuperar un ciclo de zancada, ángulo de apertura y movimiento de las articulaciones normal (Manca y cols. 2020).

Guertin y colaboradores en el año 2011, reportaron que después de realizar una inmovilización durante un periodo prolongado, se tiene la pérdida inmediata e inclusive irreversible del control motor voluntario, por lo cual se tendrán consecuencias irreversibles. Sin embargo, Harnie y colaboradores 2019, reportaron en su estudio que, en gatos que presentaron una lesión en la médula espinal, no requieren de ningún tipo de rehabilitación especial para poder recuperar la locomoción normal, mencionan que esta se recuperará conforme el individuo comience a caminar y las redes excitadoras vuelvan a recibir la señal de los CPG's. Concluyeron que el retorno de la excitabilidad neuronal depende más de cada tipo de individuo y el grado de lesión (Harnie y cols. 2019).

8.2. Efectos de la inmovilización muscular durante un periodo de 7 días sobre las características histológicas de los músculos sóleo y Extensor digitorum longus (EDL)

Los requerimientos metabólicos de los músculos dependen de su fenotipo, el control nervioso, plasticidad, etc. Cada mionúcleo controla la transcripción y síntesis de proteínas de un número limitado de fibras, lo cual está asociado con el CSA. Además, los mionúcleos se encargan de regular determinada cantidad de citoplasma para asegurar el funcionamiento correcto de la fibra (Kraemer y Spiering 2007; Teixeira y Duarte 2016). En el presente trabajo se observó que el músculo sóleo presentó una disminución significativa del CSA y DMN después de la inmovilización lo que puede indicar el inicio de un proceso de atrofia muscular, como lo reportado por Teixeira y Duarte (2016), donde asocian la atrofia muscular y la disminución del

DMN con la baja demanda de síntesis proteica y la inducción a apoptosis (Teixeira y Duarte 2016). Se ha reportado también que 10 días después de una lesión en la médula espinal provoca la disminución del 40% CSA y DMN en el músculo sóleo (Guertin 2011). Aunque en este trabajo no existe como tal una denervación, la inmovilización produce efectos importantes sobre el músculo sóleo.

Respecto al número de núcleos periféricos y centrales el no encontrar cambios significativos coincide con lo reportado por Hikida y colaboradores (1997), quienes reportaron una disminución del CSA y DMN, sin tener un incremento en el número de núcleos periféricos y centrales.

En el músculo EDL la inmovilización por 7 días de la extremidad derecha no modificó las características histológicas. Esto puede estar asociado al fenotipo de las fibras, la posición en la que se realizó la inmovilización y el tiempo de inmovilización (Frimel y cols. 2005; Boonyarom e Inui 2006). Lo que concuerda con lo reportado por Guertin (2011), donde menciona que incluso dos semanas después del desuso muscular no son suficientes para producir cambios en las características histológicas del músculo EDL, lo cual asocia al fenotipo de sus fibras musculares (Tipo II). Las catepsinas son proteínas que están involucradas en el rompimiento y degradación de proteínas sarcolémicas. Estas proteínas están presentes durante la inmovilización muscular, sin embargo, en músculos como el músculo EDL las encontramos en menor concentración, por lo cual esto podría estar asociado con los resultados obtenidos en el presente trabajo (Bonaldo y Sandi 2013). Estudios previos realizado en ratas que pertenecían al programa Space Shuttle Endeavour/SE-03 1993 de la NASA, mostraron que las fibras musculares tipo II presentaron menor atrofia en comparación con las fibras tipo I. El músculo EDL no presenta alteraciones tan evidentes en protocolos como lesión de la médula espinal o inmovilización incluso dos semanas después (Hikida y cols. 1997). Para corroborar esta información, sería necesario realizar una inmovilización durante un periodo más prolongado.

8.3. Caracterización histoquímica de los músculos sóleo y *Extensor digitorum longus* (EDL)

El músculo sóleo y el EDL presentan características histoquímicas diferentes, esto debido a la función que realiza cada uno de acuerdo con su posición anatómica corporal. Por un lado, el músculo sóleo es uno de los principales músculos del grupo flexor plantar, el cual impide que el cuerpo al estar de pie se vaya de frente (Palastanga y cols. 2007). El fenotipo maduro de este músculo es lento (fibras de tipo I) y presenta gran resistencia a la fatiga (Schiaffino y Regianni 2011; Talbot y Maves 2016). El músculo sóleo presenta mayor concentración de catepsina, por lo cual tiene mayor probabilidad a presentar atrofia muscular, así como reducción en el tamaño y masa (Van Wessel y cols. 2010; Bonaldo y Sandri 2013; Trevino y cols. 2019). Por otro lado, el EDL es uno de los músculos del grupo extensor, el cual permite la extensión de las articulaciones interfalángicas y la dorsoflexión del pie (Palastanga y cols. 2007). Conformado principalmente por fibras rápidas-glucolíticas (Tipo II), por lo cual no presenta gran resistencia a la fatiga (Schiaffino y cols. 1970; Van Wessel y cols. 2010). Esta información concuerda con lo observado en el presente trabajo en el grupo control. La histoquímica NADH-TR mostró una gran actividad metabólica oxidativa en el músculo sóleo y una actividad oxidativa y glucolítica proporcional en el músculo EDL. Estos músculos juegan un papel de importancia en la vida diaria, debido a que participan activamente en el equilibrio y en la locomoción. Después de presentar algún tipo de lesión, inmovilización estos se pueden ver comprometidos.

En el presente trabajo se encontró que, transcurrido el periodo de inmovilización, el metabolismo del músculo sóleo no presentó diferencias significativas entre el grupo control y el grupo inmovilizado. Tomanek y Lund (1973) y Boonyarom e Inui (2006) han reportado que después de pocas semanas de inmovilización se presentan cambios en el fenotipo de las fibras tipo I y comienzan a tener características de fibras tipo II (Tomanek y Lund 1973; Boonyarom e Inui 2006). Sin embargo, el tiempo de inmovilización empleado en el presente estudio fue tan poco que no fue suficiente para producir cambios en el metabolismo y fenotipo de sus fibras. La posición, tiempo y tipo de lesión son los principales factores en alterar el fenotipo de las fibras musculares y ocasionar atrofia muscular (Guo y cols. 2012; Teixeira y Duarte 2016; Wall y cols. 2016). Para el EDL, no se encontraron cambios significativos en la proporción de las fibras entre

el grupo control y el grupo inmovilizado, la histoquímica NADH-TR mostró que para ambos grupos se tenía un metabolismo glucolítico-oxidativo. Esto concuerda con la descripción de las fibras musculares de Rodríguez y colaboradores 2020, donde reportan que el músculo EDL es principalmente rápido y presenta fibras intermedias. Esta información se puede correlacionar con los resultados de la histoquímica ATPasa básica pH 9.4 en los cuales no se presentaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo inmovilizado, teniendo fibras musculares principalmente rápidas (Tipo IIb) e intermedias (Tipo IIa/IIc). Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con información previamente reportada por Boonyarom e Inui (2006) donde mencionan que el músculo EDL no presenta cambios en el fenotipo de las fibras a las pocas semanas de una lesión (Boonyarom e Inui 2006; Guertin 2011).

Es posible que, debido al corto tiempo de inmovilización, no se haya presentado alteraciones en el fenotipo de las fibras musculares de ambos músculos, pero si comenzar daño a nivel celular (disminución del CSA y DMN, distribución de las fibras por rangos del área transversal) y alteraciones a nivel locomotor no solo en la extremidad inmovilizada, sino también en la contralateral.

9. CONCLUSIONES

9.1. Conclusión general

- i. La inmovilización muscular de la extremidad posterior derecha durante 7 días altera el ciclo de zancada en la extremidad ipsilateral y contralateral; así como las características histológicas del músculo sóleo.

9.2 Conclusiones particulares

- i. La inmovilización de la extremidad posterior derecha ocasiona alteraciones a nivel locomotor.
- ii. La longitud y velocidad del ciclo de zancada se altera de manera significativa en las patas ipsilateral.
- iii. La duración y velocidad del ciclo de zancada se altera de manera significativa únicamente en la pata contralateral.
- iv. La inmovilización muscular no incrementa el porcentaje de fibras lentas (Tipo I) en el músculo EDL. Esto se puede relacionar con el periodo de inmovilización.
- v. La inmovilización muscular disminuye el CSA y DMN del músculo sóleo, pero no del EDL esto puede estar asociado al fenotipo de las fibras de cada músculo, degradación de proteínas y el comienzo de un proceso de atrofia muscular.
- vi. La inmovilización muscular durante un periodo de 7 días no ocasiona alteraciones en los núcleos periféricos y centrales del músculo sóleo y EDL.
- vii. La inmovilización muscular durante un periodo de 7 días, no altera el fenotipo y metabolismo de las fibras musculares del músculo sóleo y EDL. Esto se puede asociar con el periodo de inmovilización.

10. PERSPECTIVAS

- i. Determinar si después de la inmovilización, se presenta daño a nivel neuronal en los centros generadores de patrón (CPG's) ocasionado por el proceso de desuso.
- ii. Determinar si ocurren alteraciones en las extremidades anteriores y distintas articulaciones ocasionado por la inmovilización muscular, ya que la locomoción es una actividad de coordinación entre las extremidades anteriores y posteriores.
- iii. Realizar rehabilitación en el grupo inmovilizado para determinar si la locomoción es recuperada de manera autónoma o se requiere una terapia específica.
- iv. Determinar si la contracción muscular y la fuerza tetánica se alteran después de un tiempo de desuso.
- v. Realizar la ubicación de células satélite y sarcómeros para determinar si existe un proceso de atrofia desde los 7 días de inmovilización.
- vi. Realizar un protocolo de inmovilización muscular de mayor tiempo y en distinta posición de la extremidad para determinar las alteraciones en estos músculos bajo distintos protocolos.

11. APÉNDICE

11.1 Análisis de la locomoción del resto de los individuos del grupo control

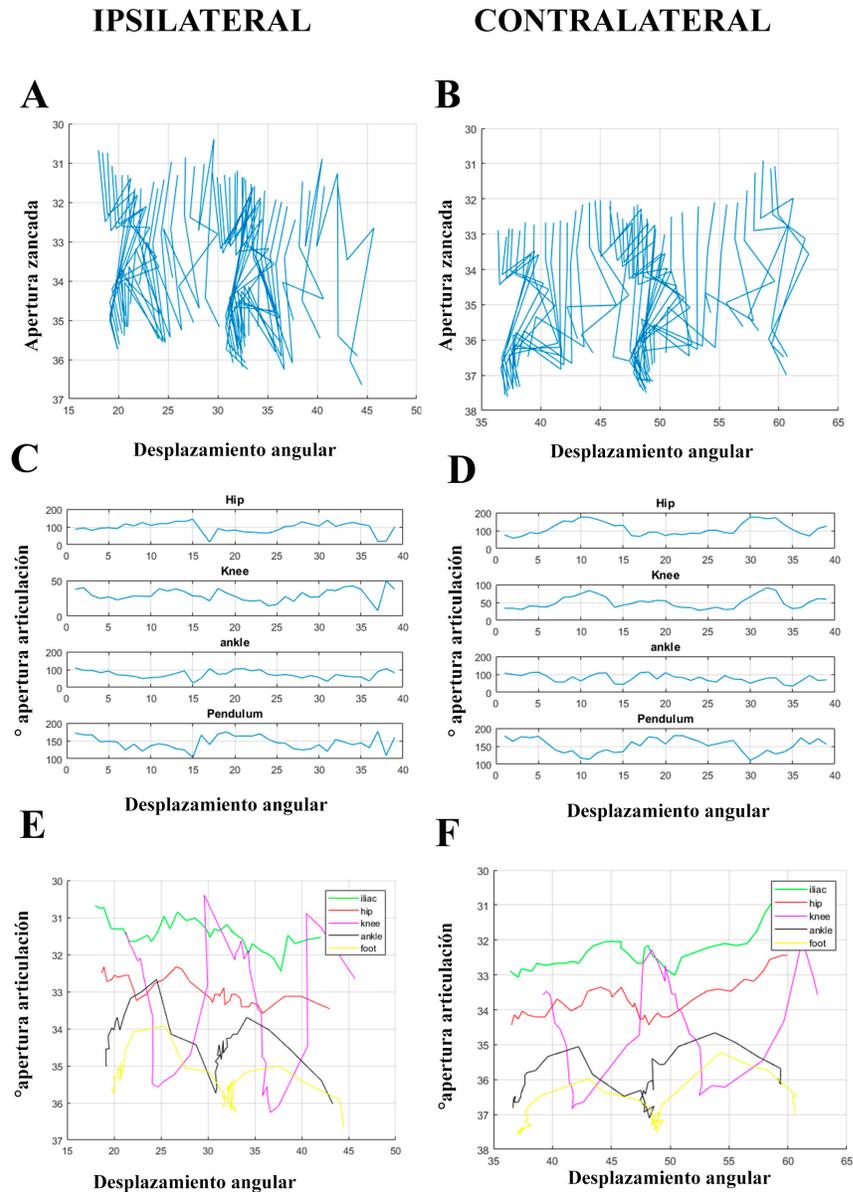
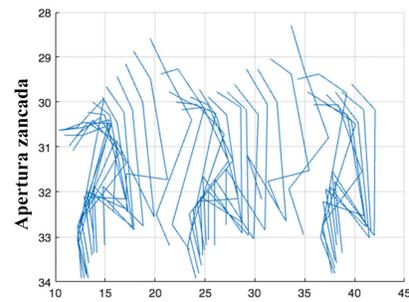


Figura 26. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo C #2. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

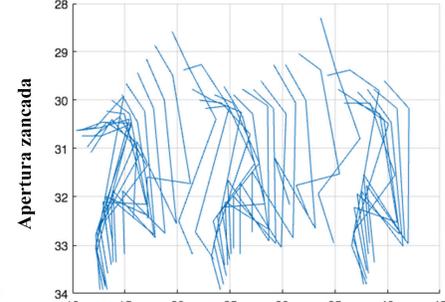
IPSILATERAL

CONTRALATERAL

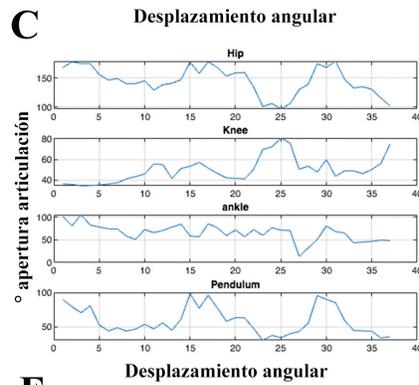
A



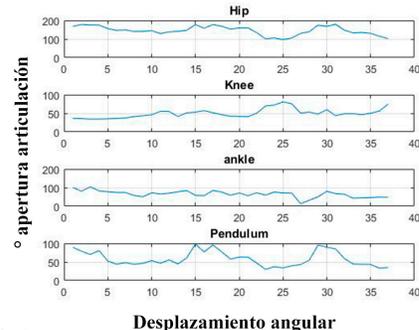
B



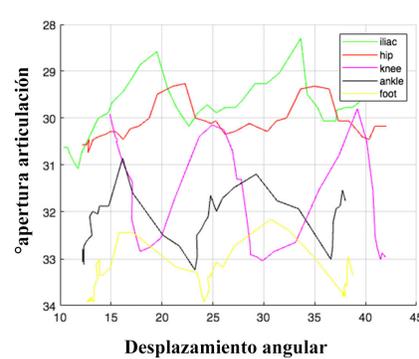
C



D



E



F

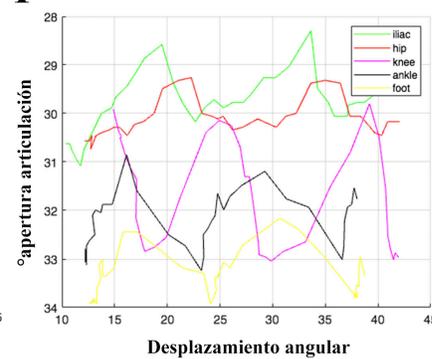


Figura 27. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo C #3. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

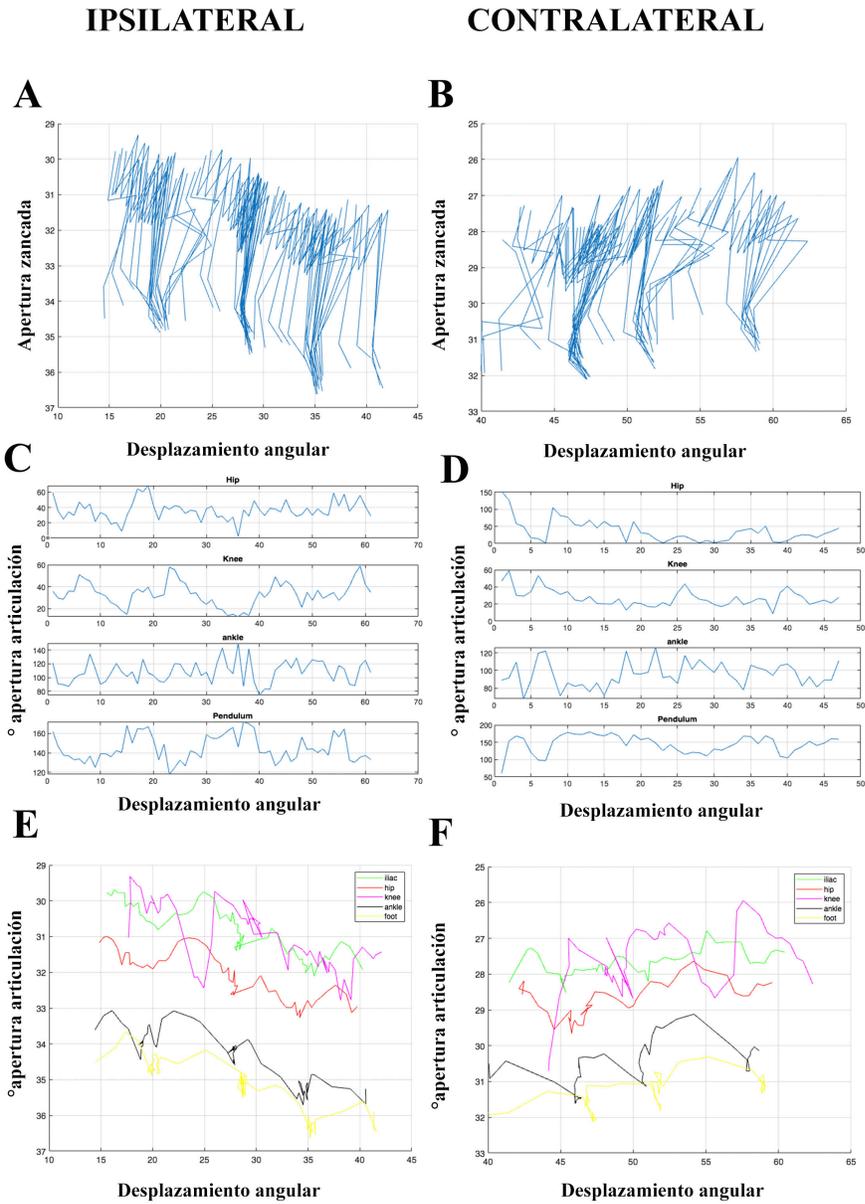
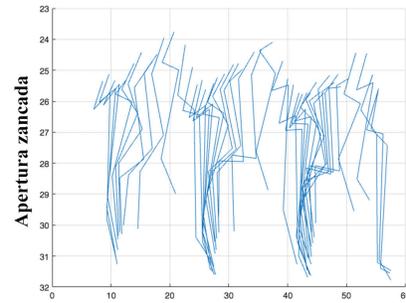


Figura 28. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo C #4. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

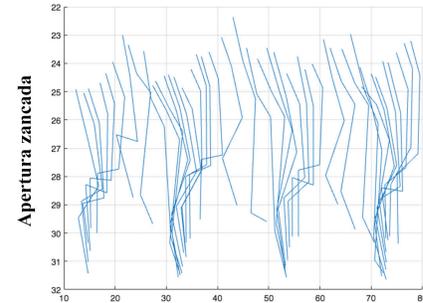
IPSILATERAL

CONTRALATERAL

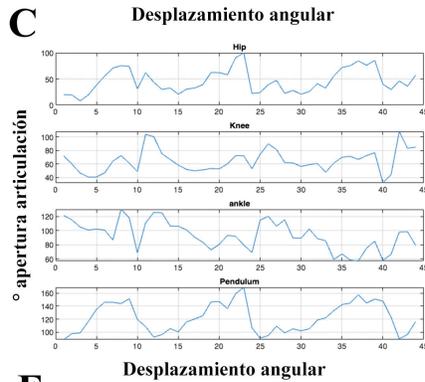
A



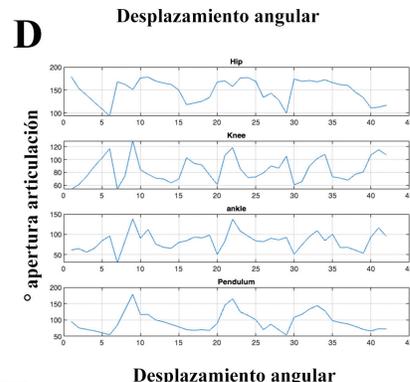
B



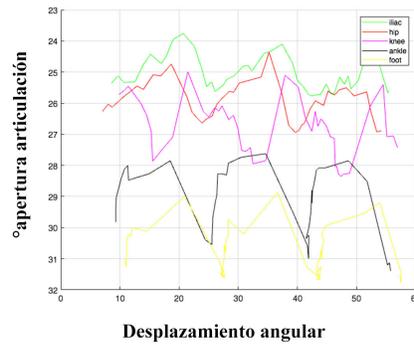
C



D



E



F

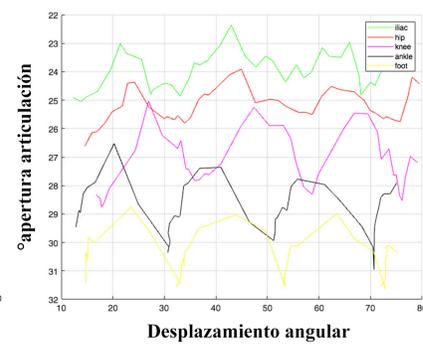


Figura 29. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo C #11. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

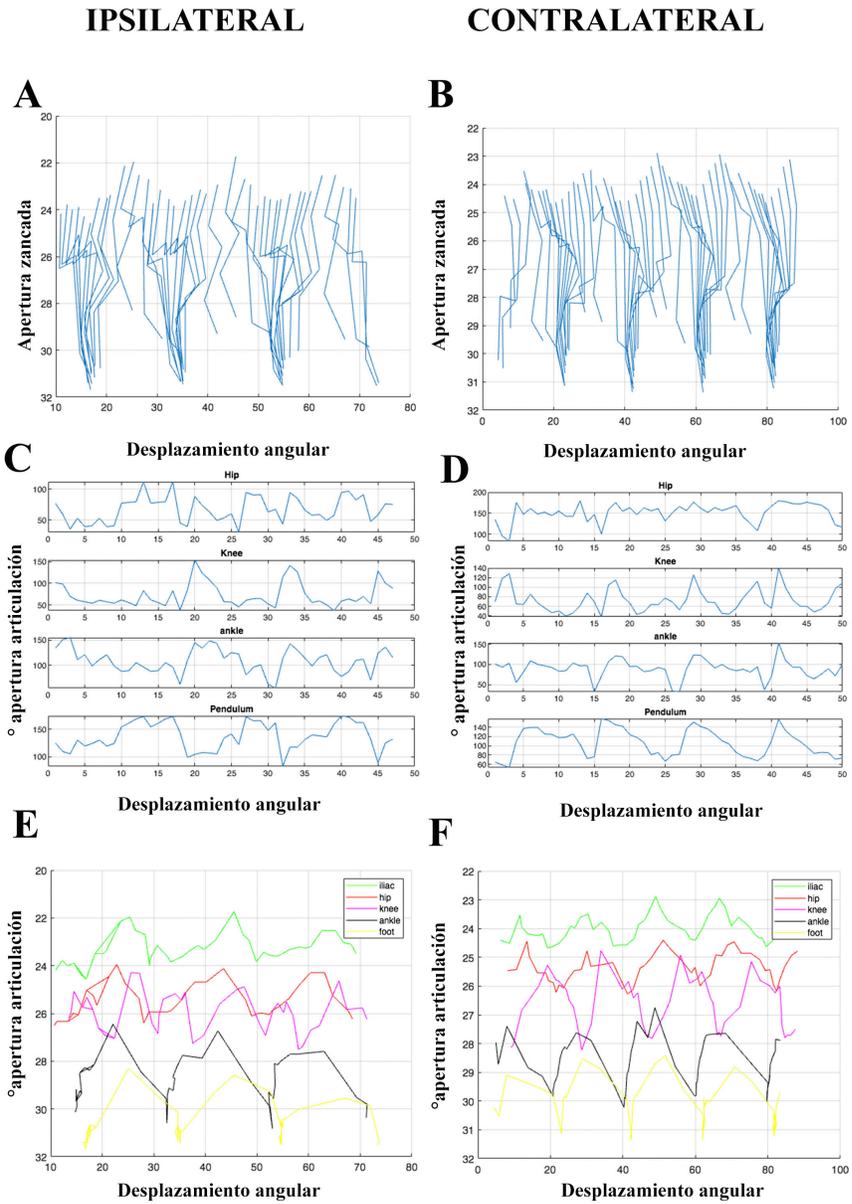


Figura 30. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo C #12. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

11.2 Análisis de la locomoción del resto de los individuos del grupo inmovilizado 7DA

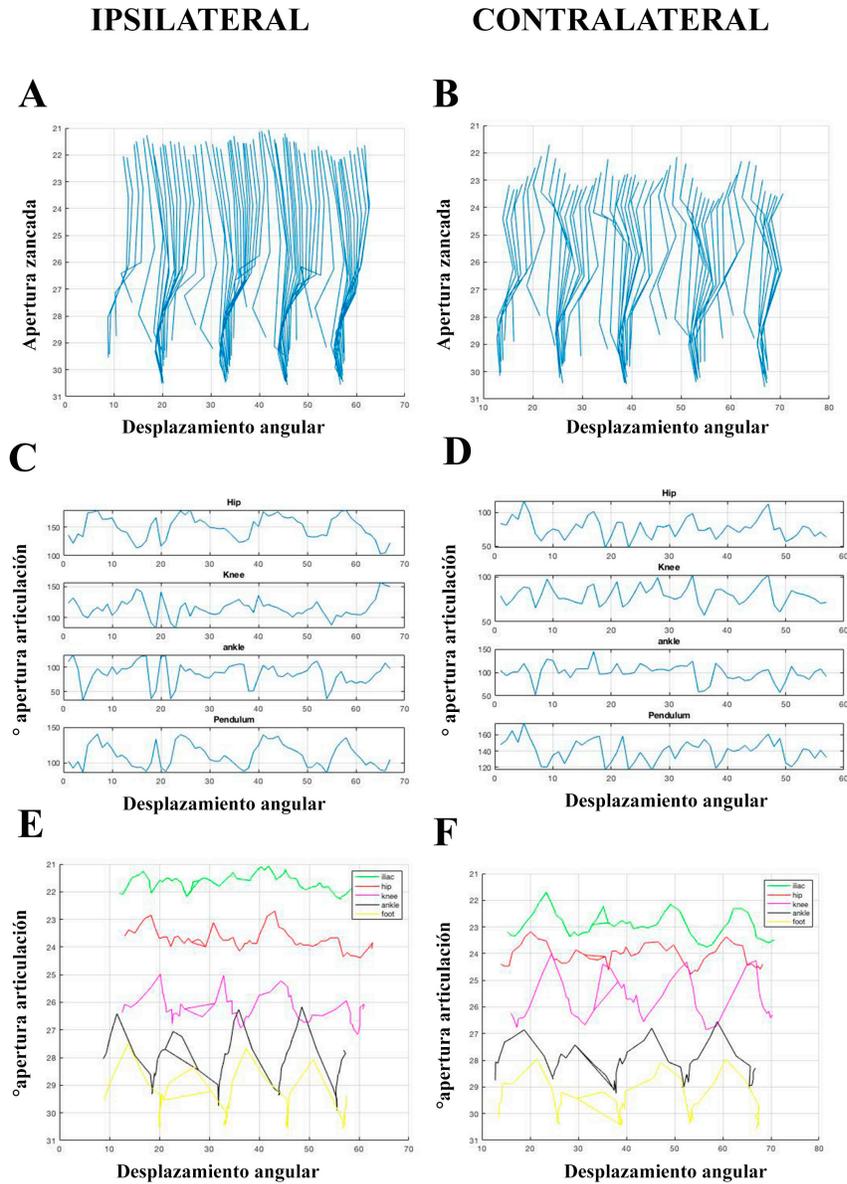


Figura 31. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo I 7DA #13. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

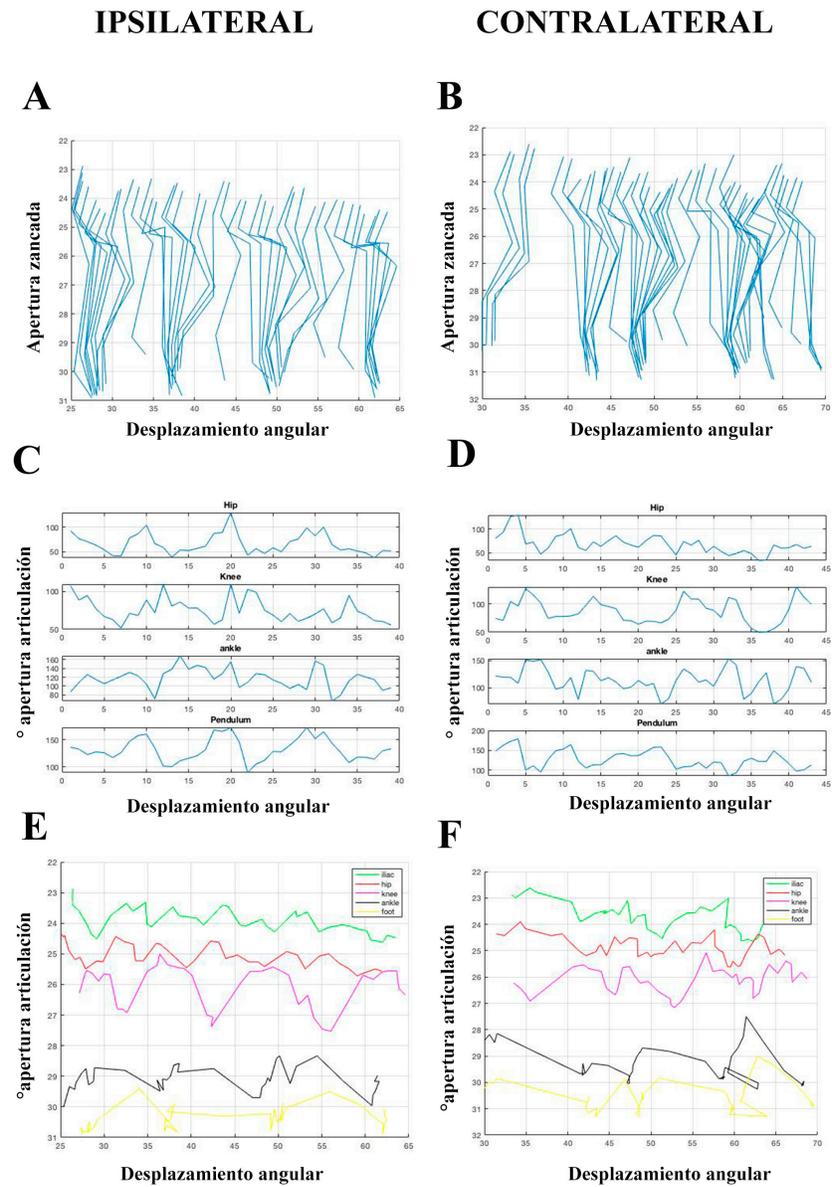


Figura 32. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo I 7DA #14. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

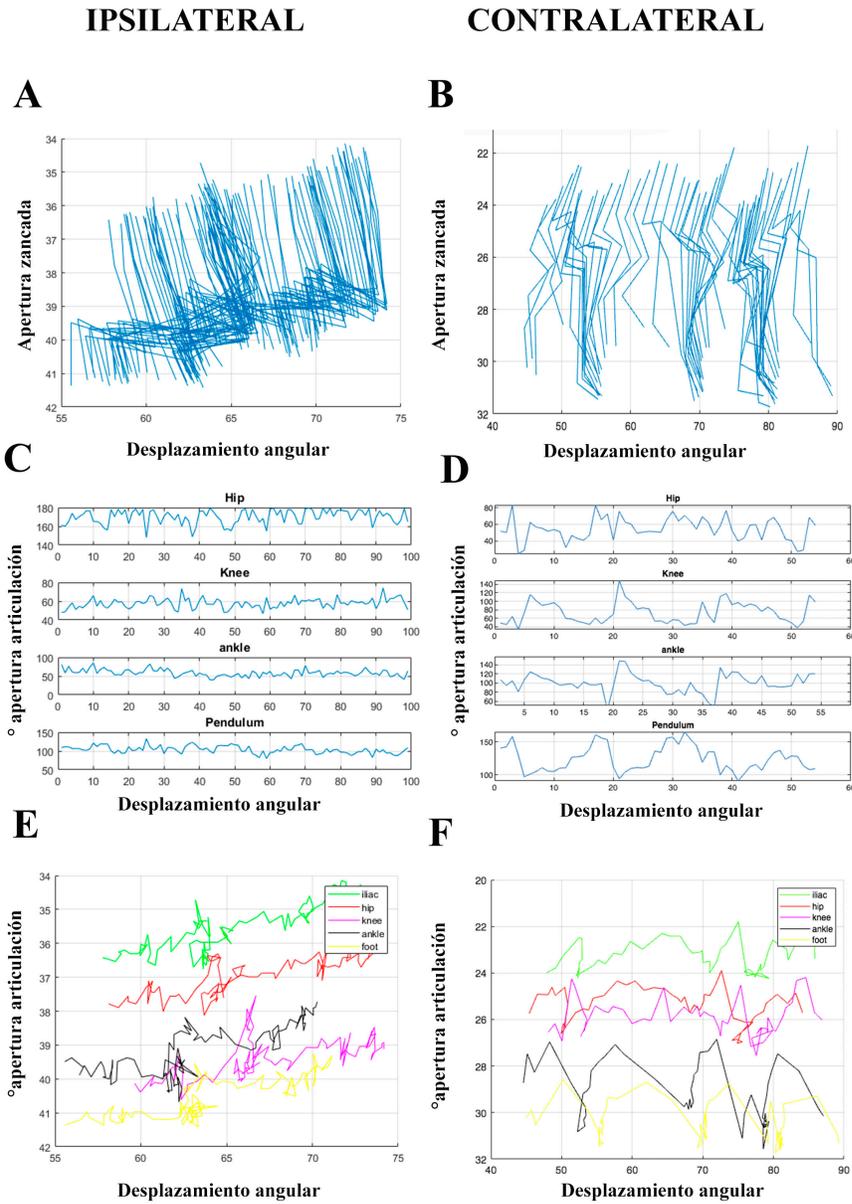


Figura 33. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo I 7DA #15. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

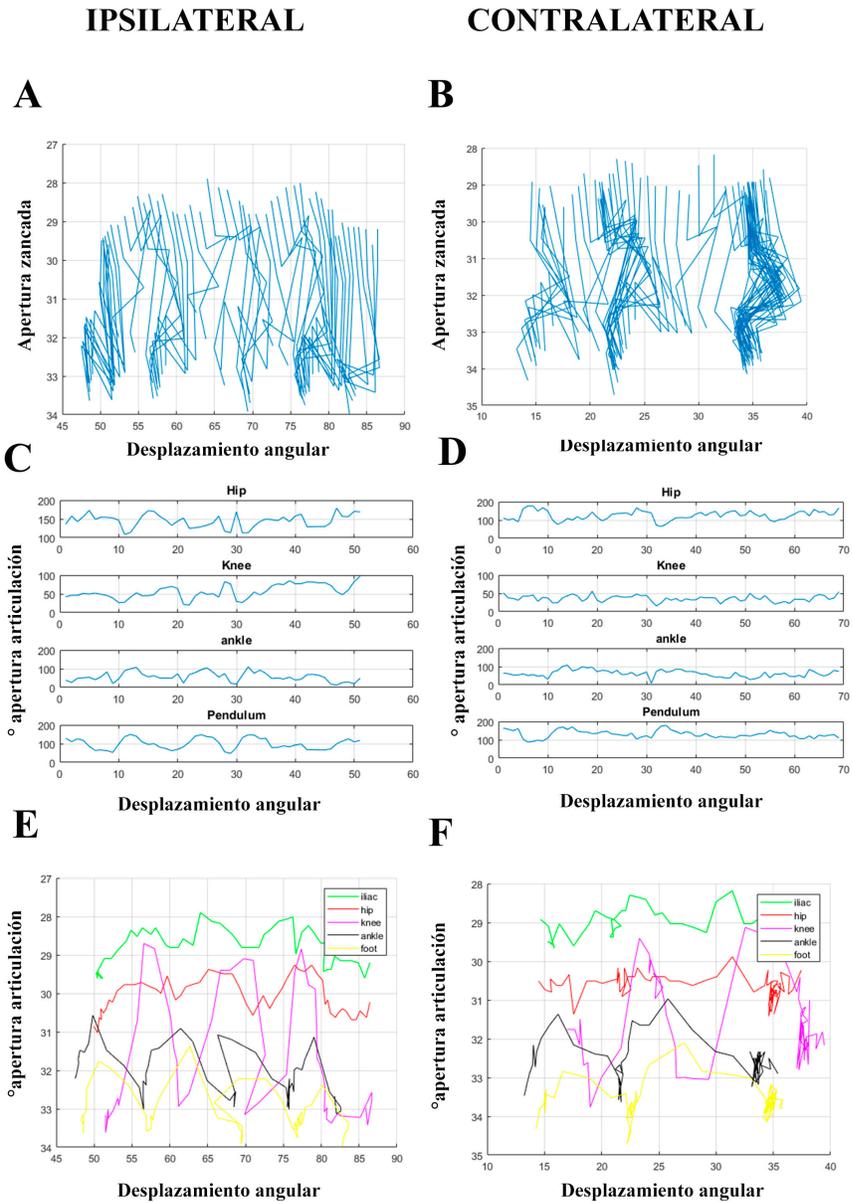


Figura 34. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo I 7DA #16. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

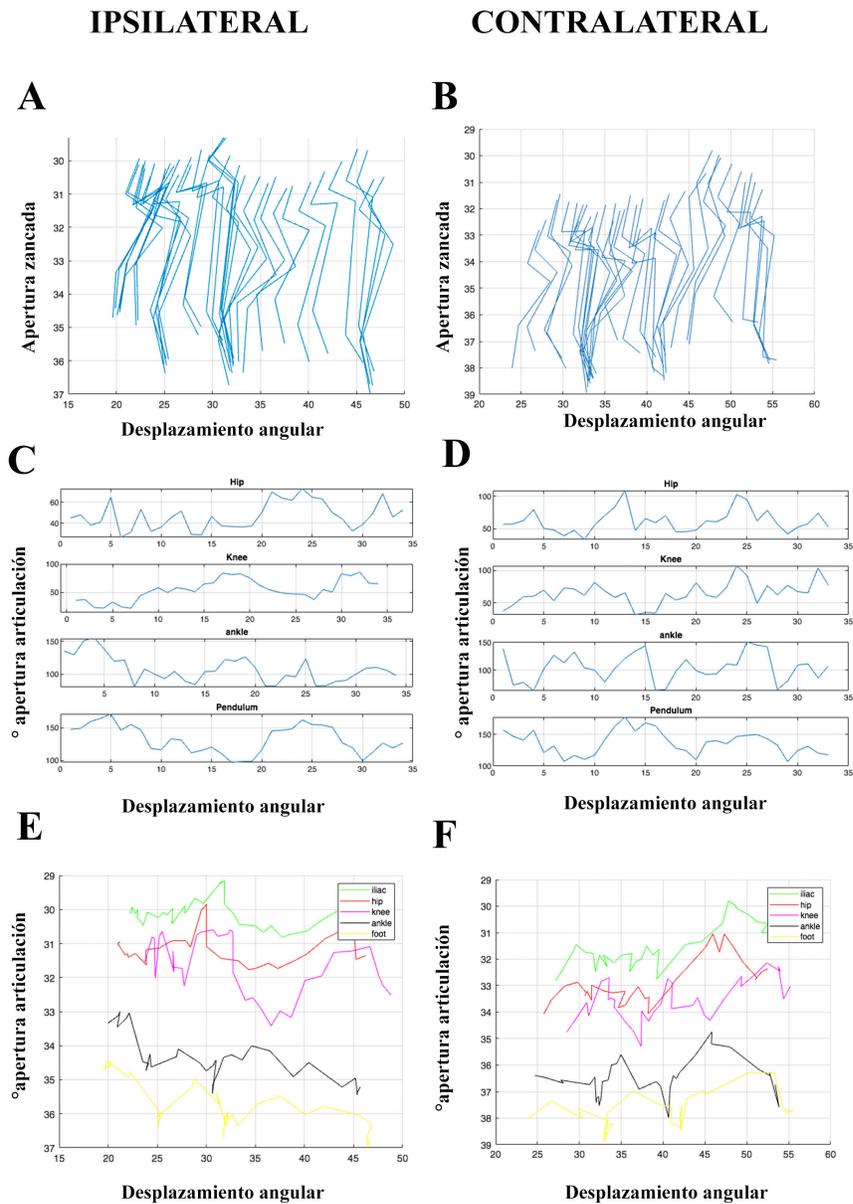


Figura 35. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo I 7DA #17. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

11.3. Análisis de la locomoción del resto de los individuos del grupo inmobilizado
7DD

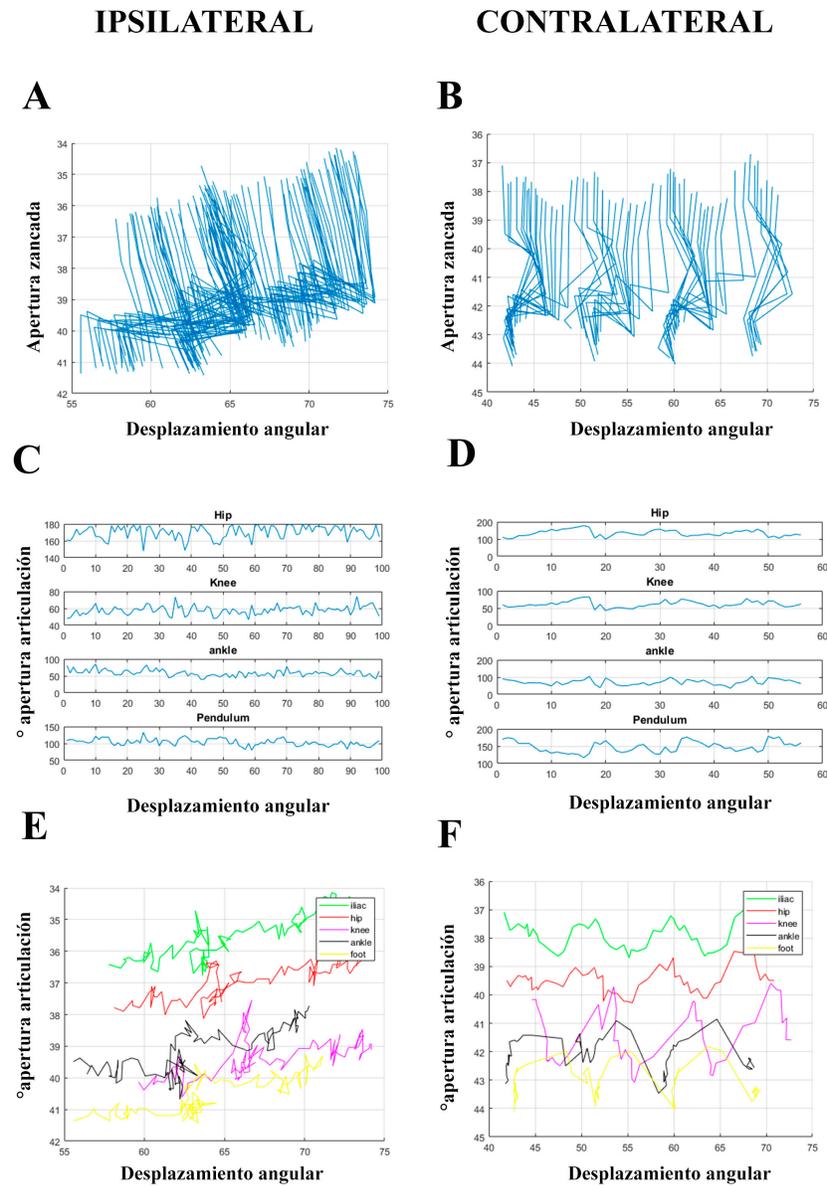


Figura 36. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo I 7DD #13. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

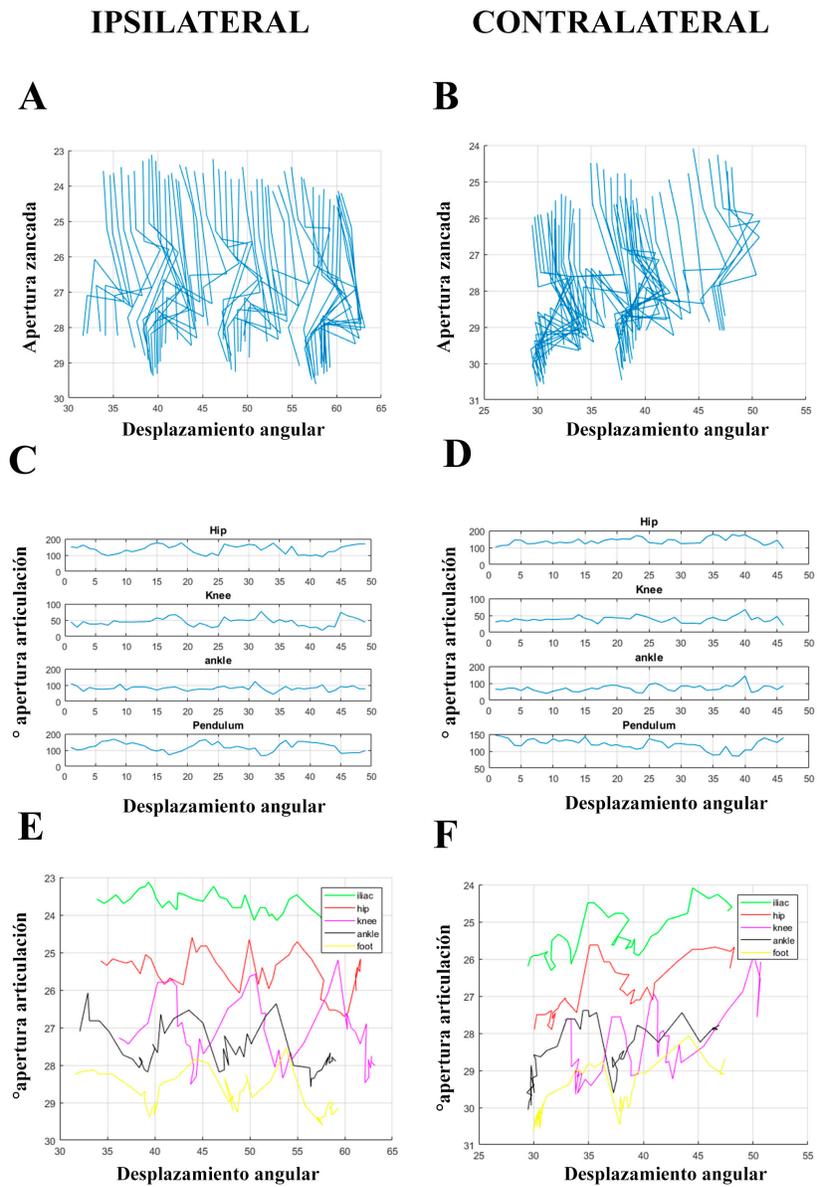


Figura 37. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo I 7DD #14. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

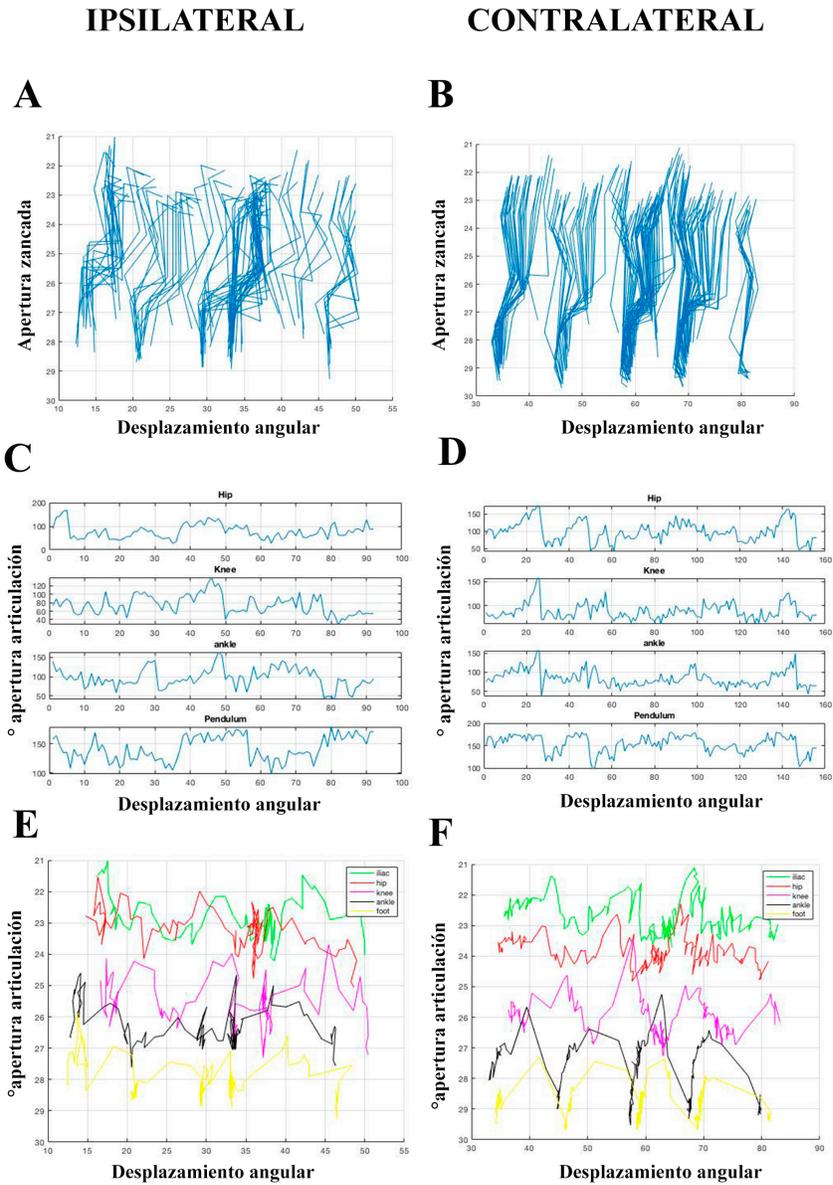


Figura 38. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo I 7DD #15. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

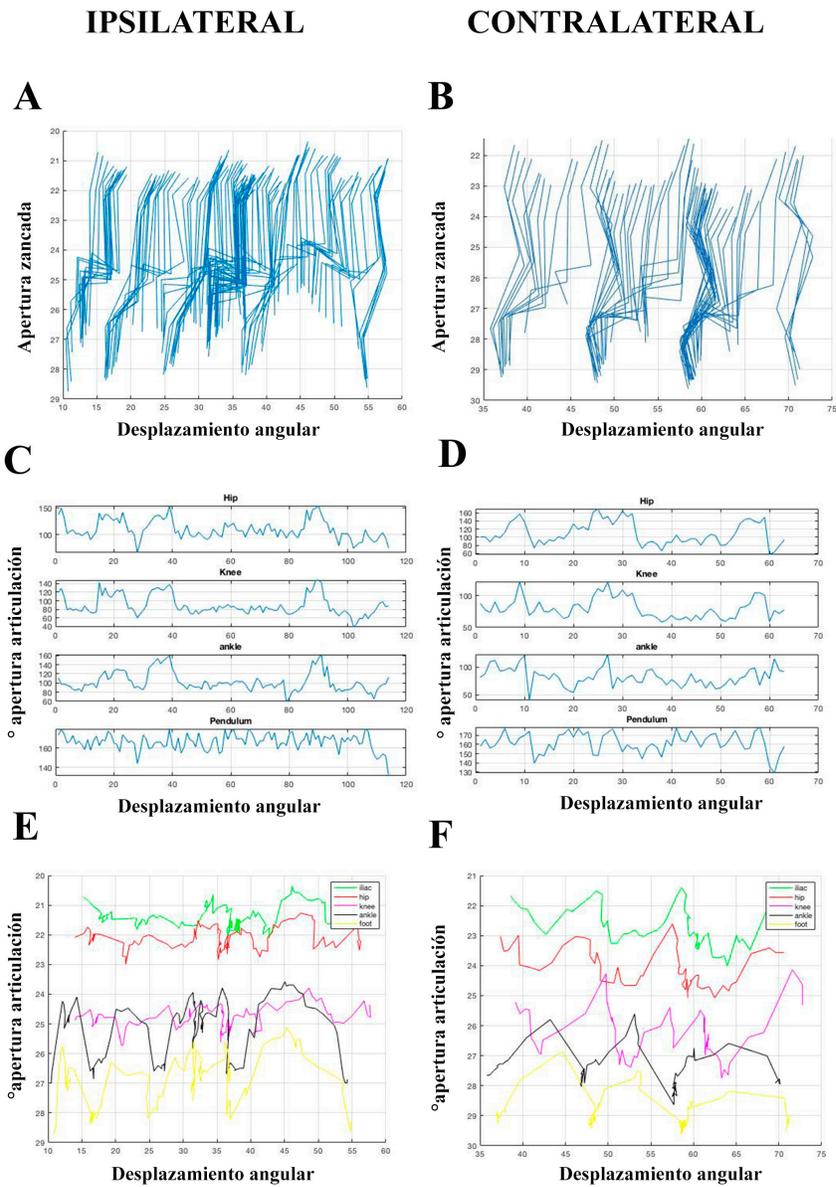


Figura 39. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo I 7DD #16. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

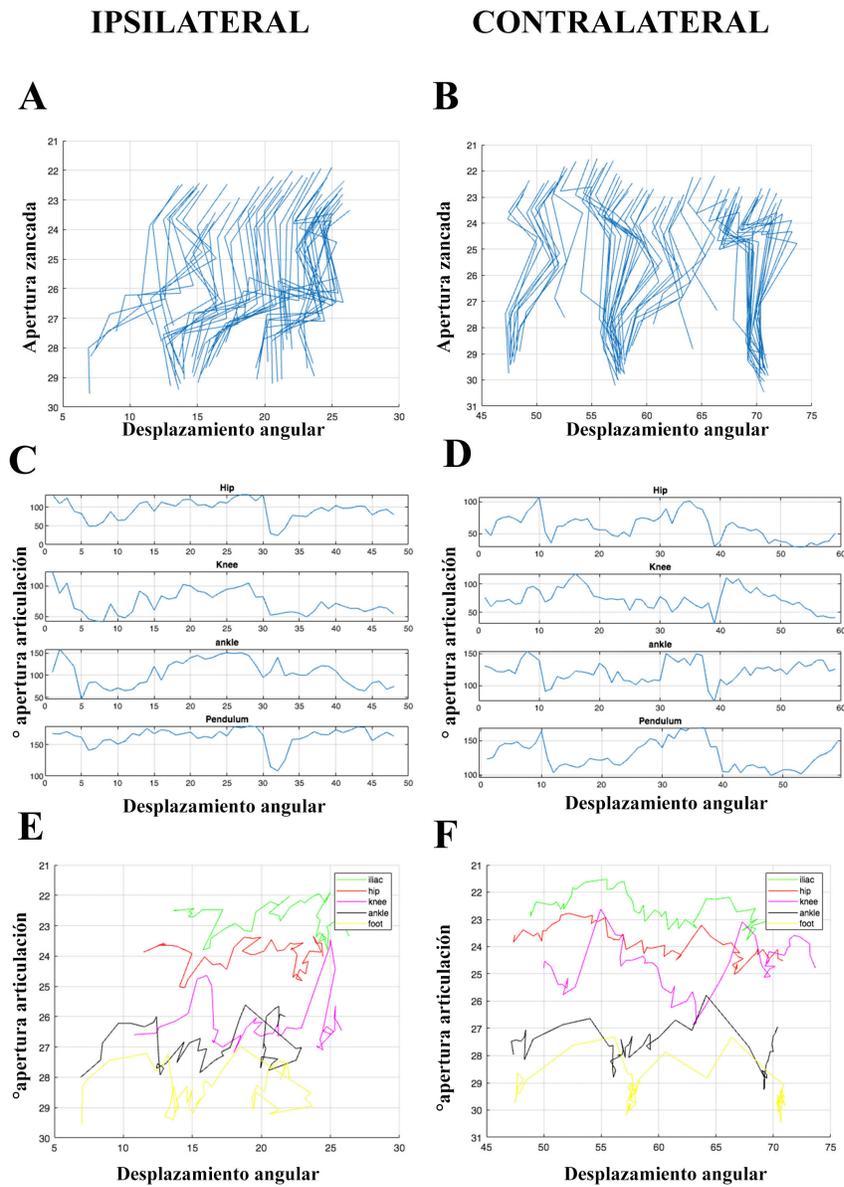


Figura 40. Análisis del ciclo de zancada grupo control de la extremidad ipsilateral y contralateral grupo I 7DD #17. A, B patrón de tres zancadas consecutivas de la extremidad ipsilateral y contralateral, respectivamente; C, D, ángulo de apertura de la cresta iliaca, cadera, rodilla y tobillo, así como el movimiento tipo péndulo; y E, F, movimiento de la cresta iliaca, cadera, rodilla, tobillo y pie (n=6).

12. REFERENCIAS

Balice-Gordon RJ, Thompson WJ. 1988. The organization and development of compartmentalized innervation in rat extensor digitorum longus muscle. *The Journal of physiology*, 398, 211–231. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017039>

Barret KE, Barrman SM, Boitano S. & Brooks HL. 2013. Tejido excitable: Músculo. *Fisiología Médica* (24th ed., pp. 97-116). México: *Mc Graw Hill companies*.

Boonyarom O, Inui K. 2006. Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 188(2), 77–89. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01613.x>

Bonaldo P, Sandri M. 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models & mechanisms*, 6(1), 25–39. <https://doi.org/10.1242/dmm.01038>

Bucher D, Haspel G, Golowasch J, Nadim. F. 2015. Central pattern generators. En: *eLS*. (eds.) Editorial: John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Cárdenas-Hernández FP, Rodríguez-Sánchez JM. 2007. Sistema de visión digital para el análisis cinemático de la marcha en las extremidades posteriores de *Rattus norvegicus* ante lesiones espinales y supraespinales. Tesis de licenciatura en Ingeniero en Biónica. Instituto Politécnico Nacional.

Cohen S, Zhai B, Gygi SP, Goldberg AL. 2012. Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *The Journal of cell biology*, 198(4), 575–589. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110067>

Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Salvini TF. 2002. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 35(11), 1329–1332. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2002001100010>

Coutinho EL, Gomes AR, França CN, Oishi J, Salvini TF. 2004. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 37(12), 1853–1861. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004001200011>

Cucarían JD, León LA, Luna GA, Torres MR, Corredor K, Cardenas F. 2017. Caracterización temporo-espacial del patrón de marcha en roedores como modelo animal de lesión cerebrovascular. *Acta biología colombiana*, 22 (3), 307-321. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n3.65244>

Da Silva CA, Guirro RR, Polacow ML, Cancelliero KM, Durigan JL. 2006. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 39(7), 979–985. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006000700016>

Darr KC, Schultz E. 1987. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 63(5), 1816–1821. <https://doi.org/10.1152/jappl.1987.63.5.1816>

De la Torre Valdovinos B, Duenas Jimenez JM, Estrada IJ, Banuelos Pineda J, Franco Rodriguez NE, Lopez Ruiz JR, Osuna Carrasco LP, Candanedo Arellano A, Duenas Jimenez SH. 2016. Tamoxifen Promotes Axonal Preservation and Gait Locomotion Recovery after Spinal Cord Injury in Cats. *Journal of veterinary medicine*, 2016, 9561968. <https://doi.org/10.1155/2016/9561968>

Diogo CC, Da Costa LM, Pereira JE, Filipe V, Couto PA, Geuna S, Armada-da-Silva, PA, Maurício AC, Varejão A. 2019. Kinematic and kinetic gait analysis to evaluate functional recovery in thoracic spinal cord injured rats. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 98, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.027>

Elices I, Varona P. 2017. Asymmetry Factors Shaping Regular and Irregular Bursting Rhythms in Central Pattern Generators. *Frontiers in computational neuroscience*, 11, 9. <https://doi.org/10.3389/fncom.2017.00009>

Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. 2014. The machinery of macroautophagy. Review. *Cell Research*. 24:24-41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>

Frimel TN, Kapadia F, Gaidosh GS, Li Y, Walter GA, Vandenborne K. 2005. A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. *Muscle & nerve*, 32(5), 672–674. <https://doi.org/10.1002/mus.20399>

Frontera WR, Ochala J. 2015. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96(3), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>

Guertin PA 2011. Adaptations of the motor system in animal models of spinal cord injury and disuse. En: *Biomechanics in Applications*. (Eds.). Editorial: InTechOpen. pp.165

Guitart M, Lloreta J, Mañas-García L, Barreiro E. 2017. Muscle regeneration potential and satellite cell activation profile during recovery following hindlimb immobilization in mice. *Journal of cellular physiology* 233(5), <https://doi.org/10.1002/jcp.26282>.

Guo BS, Cheung KK, Yeung SS, Zhang BT, Yeung EW. 2012. Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. *PLoS One*. 2012;7(1):e30348. doi:10.1371/journal.pone.0030348

Harnie J, Doelman A, De Vette E, Audet J, Desrochers E, Gaudreault N, Frigon A. 2019. The recovery of standing and locomotion after spinal cord injury does not require task-specific training. *eLife*, 8, e50134. <https://doi.org/10.7554/eLife.50134>

Hikida RS, Van Nostran S, Murray JD, Staron RS, Gordon SE, Kraemer WJ. 1997. Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibers. *The Anatomical record*, 247(3), 350–354. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199703\)247:3<350::AID-AR6>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199703)247:3<350::AID-AR6>3.0.CO;2-Y)

Hoppeler H, Fluck M. 2003. Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Medicine and science in sports and exercise*, 35(1), 95–104. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000043292.99104.12>

Järvinen TA, Józsa L, Kannus P, Järvinen TL, Järvinen M. 2002. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *Journal of muscle research and cell motility*, 23(3), 245–254. <https://doi.org/10.1023/a:1020904518336>

Klarner T, Zehr EP. 2018. Sherlock Holmes and the curious case of the human locomotor central pattern generator. *Journal of neurophysiology*, 120(1), 53–77. <https://doi.org/10.1152/jn.00554.2017>

Kraemer WJ, Spiering BA. 2007. Skeletal muscle physiology: plasticity and responses to exercise. *Hormone Research* 66 (suppl 1):2-16. Doi: 10.1159/000096617.

Koulmann N, Richard-Bulteau H, Crassous B, Serrurier B, Padeloup M, Bigard X, Banzet S. 2017. Physical exercise during muscle regeneration improves recovery of the slow/oxidative phenotype. *Muscle & nerve*, 55(1), 91–100. <https://doi.org/10.1002/mus.25151>

López-Chicarro J, Fernández-Vaquero A. 2006. Estructura y función del músculo esquelético. En: *Fisiología del deporte*. (Eds.). Editorial: Médica panamericana. pp.83

Lovato-Salas F, Luna-Pizarro D, Oliva-Ramírez SA, Flores-Lujano J, Núñez-Enríquez JC. 2015. Prevalencia de fracturas de cadera, fémur y rodilla en la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Traumatología y Ortopedia "Lomas Verdes" del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Acta ortopedica mexicana*, 29(1), 13–20.

Manca, A., Peruzzi, A., Aiello, E., Cereatti, A., Martinez, G., Deriu, F., & Della Croce, U. (2020). Gait changes following direct versus contralateral strength training: A randomized controlled pilot study in individuals with multiple sclerosis. *Gait & posture*, 78, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2020.02.017>

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 62(4A), 609–614. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400008>

Marder E, Calabrese RL. 1996. Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiological reviews*, 76(3), 687–717. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.3.687>

McCrea DA, Rybak IA. 2008. Organization of the mammalian locomotor rhythm and pattern generator. *Brain Research Reviews*, 57 134-146. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.006>

Moore, K.L., Dailey, A.F., & Agur, A.M.R. (2002). Introducción a la anatomía clínica. En: *Fundamentos de Anatomía con orientación clínica* (2da Eds). Editorial: Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 17

Murach KA, Bagley JR, Mclelland KA, Arévalo JA, Ciccone AB, Malyszek KK, Wen Y, Galpin AJ. 2016. Improving human skeletal muscle myosin heavy chain fiber typing efficiency. *J. Muscle Res Cell Motil*, 37:1-5. <https://doi.org/10.1007/s10974-016-9441-9>

Oku M, Sakai Y. 2018. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 40(6), e1800008. <https://doi.org/10.1002/bies.201800008>

Paccola CC, Resende CG, Stumpp T, Miraglia SM, Cirpiano I. 2013. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal reproduction*, 10(4), 677-683.

Palastanga N, Field D, Soames R. 2007. Músculos. En: Anatomía y movimiento humano. Estructura y funcionamiento (3ra Eds). Editorial: Paidotribo. pp.256

Paul PK, Gupta SK, Bhatnagar S, Panguluri SK, Darnay BG, Choi Y, Kumar A. 2010. Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *The Journal of cell biology*, 191(7), 1395–1411. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006098>

Rosser BW, Dean MS, Bandman E. 2002. Myonuclear domain size varies along the lengths of maturing skeletal muscle fibers. *The International journal of developmental biology*, 46(5), 747–754.

Rodriguez-Torres EE, Viveros-Rogel J, López-García K, Vázquez-Mendoza E, Chávez-Fragoso G, Quiroz-González S, Jiménez-Estrada I. 2020. Chronic Undernutrition Differentially Changes Muscle Fiber Types Organization and Distribution in the EDL Muscle Fascicles. *Frontiers in physiology*, 11, 777. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00777>

Ruíz-Martínez F, Caldelas-Cuellar E, Sánchez-Sánchez M. 2001. Epidemiología y resultados clínicos de las fracturas expuestas de la tibia. *Revista Mexicana Ortopedia Traumatismo*, 15(6), 288-295.

Sandri M. 2013. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(10), 2121–2129. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.023>

Salter RS. 2000. Reacciones de los tejidos músculo esqueléticos a los trastornos. En: Trastornos y lesiones del sistema músculoesquelético (3ra Eds). Editorial: Baltimore: Williams y Wilkins. pp. 40.

Samson AL, Ju L, Ah Kim H, Zhang SR, Lee JA, Sturgeon SA, Sobey CG, Jackson SP, Schoenwaelder SM. 2015. MouseMove: an open-source program for semi-automated analysis of movement and cognitive testing in rodents. *Scientific reports*, 5, 16171. <https://doi.org/10.1038/srep16171>

Scalabrin M, Pollock N, Staunton CA, Brooks SV, McArdle A, Jackson MJ, Vasilaki A. 2019. Redox responses in skeletal muscle following denervation. *Redox biology*, 26, 101294. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101294>

Schiaffino S, Hanzlíková V, Pierobon S. 1970. Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. *The Journal of cell biology*, 47(1), 107–119. <https://doi.org/10.1083/jcb.47.1.107>

Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*, 91(4), 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>

Shi J, Luo L, Eash J, Ibebunjo C, Glass DJ. 2011. The SCF-Fbxo40 complex induces IRS1 ubiquitination in skeletal muscle, limiting IGF1 signaling. *Developmental cell*, 21(5), 835–847. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.09.011>

Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. 2001. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Physical therapy*, 81(11), 1810–1816.

Sobrian SK, Walters E. 2013. Enhanced Satellite cell activity in aging skeletal muscle after manual acupuncture- induced injury. *Scientific Research*, 5(1). <https://doi.org/10.4236/cm.2014.51004>

Talbot J, Maves L. 2016. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 5(4), 518–534. <https://doi.org/10.1002/wdev.230>

Tasić D, Dimov I, Petrović V, Savić T, y Dimov D. 2011. Fiber type composition and size of fibers in the rat tibialis anterior muscle. *Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Niš*. 28(3):161-168.

Teixeira E, Duarte, JA. 2016. Skeletal Muscle Loading Changes its Regenerative Capacity. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 46(6), 783–792. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0462-0>

Tomanek RJ, Lund, DD. 1973. Degeneration of different types of skeletal muscle fibres. I. Denervation. *Journal of anatomy*, 116(Pt 3), 395–407.

Tuthill JC, Azim E. 2018. Proprioception. *Current biology* : *CB*, 28(5), R194–R203. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.064>

Trevino MB, Zhang X, Standley RA, Wang M, Han X, Reis F, Periasamy M, Yu G, Kelly DP, Goodpaster BH, Vega RB, Coen PM. 2019. Loss of mitochondrial energetics is associated with poor recovery of muscle function but not mass following disuse atrophy. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 317(5), E899–E910. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00161.2019>

Van Wessel T, De Haan A, Van der Laarse WJ, Jaspers RT. 2010. The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *European journal of applied physiology*, 110(4), 665–694. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1545-0>

Verdijk LB, Snijders T, Beelen M, Savelberg HH, Meijer K, Kuipers H, Van Loon LJ. 2010. Characteristics of muscle fiber type are predictive of skeletal muscle mass and strength in elderly men. *Journal of the American Geriatrics Society*, 58(11), 2069–2075. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2010.03150.x>

Wall TB, Dirks ML, Snijders T, Van Dijk JW, Fritsch M, Verdijk, van Loon LJC. 2016. Short-term muscle disuse lowers myofibrillar protein synthesis rates and anabolic resistance to protein ingestion. *J Physiol Endocrinol Metab*, 310: E137-E147. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00227.2015>.

Welsch U, Sobotta J. 2008). Tejido muscular. En: *Histología* (2da Eds.). Editorial: Elsevier. pp.156

Wolfe RR. 2006. The underappreciated role of muscle in health and disease. *The American journal of clinical nutrition*, 84(3), 475–482. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.3.475>

Yang Z, Zhang D, Rocha MV, Lima PMV, Mehmet K, França FGM. 2017. Prescription of the rhythmic patterns for legged locomotion. *Neural Comput & Applic* 28,3587-3601 <https://doi.org/10.1007/s00521-016-2237-4>