



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN
DE LAS FIBRAS DE LOS FASCÍCULOS DEL MÚSCULO *EXTENSOR DIGITORUM
LONGUS* DE LA RATA (*Rattus norvegicus*)**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ENRIQUE VÁZQUEZ MENDOZA

DIRECTOR: DRA. ERIKA ELIZABETH RODRÍGUEZ TORRES

CODIRECTOR: DRA. KENIA LÓPEZ GARCÍA

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

2016



ICBI-AAB/500/2016

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH.
P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Biología **Enrique Vázquez Mendoza**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **“Efecto de la desnutrición sobre la composición y organización de las fibras de los fascículos del músculo *extensor digitorum longus* de la rata”**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

- | | |
|-------------------|---|
| PRESIDENTE: | M. en C. Mario Segura Almaraz |
| SECRETARIO | M.V.Z. Othón Enrique Straffon Muris |
| PRIMER VOCAL: | Biol. María del Carmen González Rodríguez |
| SEGUNDO VOCAL: | Dra. Erika Elizabeth Rodríguez Torres |
| TERCER VOCAL: | Dra. Kenia López García |
| PRIMER SUPLENTE: | Dr. Luis Fernando Rosas Pacheco |
| SEGUNDO SUPLENTE: | Dr. Pablo Octavio Aguilar |

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

ATENTAMENTE
“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 18 de febrero de 2016

BIOL. ULISES ITURBE ACOSTA
COORDINADOR DE LA LICENCIATURA EN BIOLÓGIA



c.c.p. Archivo

Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts. 6640 y 6642, Fax 2112
 aab_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Primeramente me gustaría agradecer a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por permitirme cursar esta licenciatura, así como a todos aquellos profesores que formaron parte de mi formación académica.

Igualmente, me gustaría dar mis más sinceros agradecimientos a mis directoras de tesis, Dra. Erika Elizabeth Rodríguez Torres y Dra. Kenia López García por todo el apoyo brindado en la elaboración de este proyecto de investigación. Así como al Dr. Ismael Jiménez Estrada por las facilidades brindadas para trabajar en su laboratorio en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), en especial a Q. B. I. Silvia Mariscal Tovar y Biot. Cindy X. Hinojosa por el apoyo técnico brindado en el desarrollo experimental. Para el desarrollo de este proyecto se contó con el financiamiento de PROMEP-1006 (a ERT) y Premio Sofia Kovalévskaya (a ERT) y estancia postdoctoral (265483 a KLG)

También me gustaría dar gracias a mis sinodales por sus correcciones y acertadas recomendaciones del presente trabajo.

Además quiero agradecer a mis amigas Yess, Edith, Araceli, Andrea, Mayra y Dulce por todos aquellos momentos que pasamos juntos y el apoyo que me brindaron todos estos años, así como a mis amigos Alexis y José Antonio por estar siempre dándome ánimos.

Finalmente, agradezco profundamente a mis padres y hermano por su apoyo y palabras de aliento dadas durante mi formación académica y elaboración de esta investigación.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1. Músculo	3
2.1.1. Músculo esquelético	5
2.1.2. Clasificación de las fibras musculares	7
2.2. Plasticidad del músculo esquelético	9
2.3. Efectos de la nutrición sobre el músculo esquelético	11
2.4. Geometría fractal	15
2.4.1. Aplicaciones en biología	17
2.4.1.1. Análisis fractales aplicados al músculo esquelético	18
2.5. Funciones de distribución	19
2.5.1. Método de funciones de base radial	19
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	
5.1. Generales	21
5.2. Particulares	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1. Animales	23
6.2. Disección y preparación del tejido para el análisis histoenzimático	23
6.2.1. Histoquímica para ATPasa alcalina (pH 9.4)	23
6.2.2. Histoquímica para NADH-TR	24
6.3. Análisis de imágenes	24
6.3.1. Determinación del metabolismo predominante en las fibras intermedias	26
6.4. Caracterización de la modificación del fenotipo de las fibras en los fascículos del músculo <i>EDL</i>	26
6.5. Análisis de la organización fractal	27
6.6. Análisis de la distribución de las fibras	28
6.7. Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS	
7.1. Parámetros morfométricos	30
7.2. Histoquímica	
7.2.1. Histoquímica para ATPasa alcalina (pH 9.4)	31
7.2.2. Histoquímica para NADH-TR	33
7.3. Proporción de fibras del tipo intermedio que poseen metabolismo oxidativo o glucolítico en los fascículos de músculos <i>EDL</i> en animales control o desnutridos	35

7.4.	Organización fractal	
7.4.1.	Fibras clasificadas por la técnica de ATPasa alcalina (pH 9.4)	36
7.4.2.	Fibras clasificadas por la técnica de NADH-TR	40
7.5.	Patrones de distribución	44
7.5.1.	Fibras clasificadas por la técnica de ATPasa alcalina (pH 9.4)	44
7.5.2.	Fibras clasificadas por la técnica de NADH-TR	48
8.	DISCUSIÓN	54
8.1.	Composición de los fascículos del m. <i>EDL</i>	54
8.2.	Efecto de la desnutrición crónica sobre la composición de los fascículos del m. <i>EDL</i>	
8.2.1.	Histoquímica para ATPasa alcalina (pH 9.4)	55
8.2.2.	Tendencia y magnitud del cambio en la expresión fenotípica de los distintos tipos de fibras en los fascículos de los músculos <i>EDL</i> desnutridos	57
8.2.3.	Histoquímica para NADH-TR	59
8.3.	Organización fractal de las fibras de los fascículos del m. <i>EDL</i>	61
8.4.	Patrones de distribución de las fibras de los fascículos del m. <i>EDL</i>	62
9.	CONCLUSIÓN	64
LITERATURA CITADA		66
GLOSARIO		81
APÉNDICES		
1.	Script para crear imágenes binarias a partir de las coordenadas X, Y de los centroides	i
2.	Método de funciones de base radial	ii
3.	Script en MatLab del método de funciones de base radial	iv
4.	Valores de los porcentajes, dimensión fractal, <i>prefactor de forma a</i> y parámetro de las fibras de los fascículos del m. <i>EDL</i> clasificadas por la técnica de ATPasa	viii
5.	Diferencias significativas entre los porcentajes de fibras de los fascículos del m. <i>EDL</i> clasificadas por la técnica histoenzimática de ATPasa alcalina (pH 9.4)	ix
6.	Diferencias significativas entre la dimensión fractal de las fibras intermedias y rápidas de los fascículos del m. <i>EDL</i>	x
7.	Valores de los porcentajes, dimensión fractal, <i>prefactor de forma a</i> y parámetro de las fibras de los fascículos del m. <i>EDL</i> clasificadas por la técnica de NADH-TR	xi
8.	Diferencias significativas entre los porcentajes de fibras de los fascículos del m. <i>EDL</i> clasificadas por la técnica histoenzimática de NADH-TR	xii
9.	Diferencias significativas entre la dimensión fractal de las fibras oxidativas y glucolíticas de los fascículos del m. <i>EDL</i>	xiii
10.	Diferencias significativas entre los porcentajes de fibras de los fascículos del m. <i>EDL</i> determinando el metabolismo de las fibras intermedias	xiv

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los distintos tipos de músculos.	3
Tabla 2. Características contráctiles, actividad enzimática y propiedades morfológicas y metabólicas de los tipos de fibras del músculo esquelético.	8
Tabla 3. Peso del m. <i>EDL</i> y longitud de los fascículos (F2, F3, F4 y F5) en los grupos control (C) y desnutrido (D) en ratas macho <i>Wistar</i> de 35 días de edad.	30
Tabla 4. Número de fibras totales en los fascículos (F2, F3, F4 y F5) del m. <i>EDL</i> en los grupos control (C) y desnutrido (D) de ratas macho <i>Wistar</i> de 35 días de edad.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conformación del músculo esquelético.	5
Figura 2. Microfotografía (A) y representación esquemática (B) de las principales estructuras las fibras musculares.	6
Figura 3. Estructura de las cadenas pesadas de miosina.	7
Figura 4. Principales factores que modifican el tamaño (A) y el fenotipo (B) de las fibras musculares.	10
Figura 5. Estados nutricionales afectando la epigenética, mediante la programación fetal.	11
Figura 6. Mapa de prevalencia de desnutrición en el mundo	12
Figura 7. A. Ubicación anatómica del músculo <i>extensor digitorum longus</i> . B. Fascículos que conforman al músculo <i>extensor digitorum longus</i> (F2-F5) en la rata <i>Wistar</i>	15
Figura 8. Triángulo de Sierpiński, uno de los fractales más representativos, el cual resulta de dos formas: 1) dividir un triángulo equilátero en cuatro y descartar la pieza central y seguir así en cada uno de los triángulos restantes; y 2) ir formando grupos de tres triángulos, los cuales se van agrupando con otros, formando supergrupos y así indefinidamente.....	16
Figura 9. Representación tridimensional de los alvéolos pulmonares, los cuales presentan una organización fractal. Los distintos colores representan a los distintos grupos que conforman a los pulmones.....	18
Figura 10. Protocolo de desnutrición crónica aplicado a ratas macho <i>Wistar</i> de 35 días de edad, así como análisis hechos a los tipos de fibras de los fascículos del m. <i>EDL</i>	22
Figura 11. Microfotografía del F5 teñido con la técnica histoenzimática de ATPasa alcalina (pH 9.4). Fibras lentas (L), de color blanco o incoloras, intermedias (I), de color negro o gris oscuro y rápidas (R), de color gris. Barra de escala, 100 μ m.	25
Figura 12. Microfotografía del F5 teñido con la técnica histoenzimática de NADH-TR. Fibras con metabolismo oxidativo (O), color azul oscuro y metabolismo glucolítico (G), color azul claro. Barra de escala, 100 μ m.	25
Figura 13. Fotomicrografía del F5 (A) teñido con la técnica de ATPasa alcalina (pH 9.4) con sus respectivas imágenes binarias de las fibras lentas (B), intermedias (C) y rápidas (D).	27
Figura 14. Ejemplo de un valor <i>N</i> óptimo (<i>N</i> =11) para una imagen histológica.....	29
Figura 15. Microfotografías del F2 del grupo control (A) y desnutrido (B), teñidos con la técnica histoenzimática de NADH-TR. Barra de escala, 200 μ m.....	31
Figura 16. Porcentaje de fibras lentas (L), intermedias (I) y rápidas (R) en cada fascículo (A, F2; B, F3; C, F4; y D, F5) del m. <i>EDL</i> en los grupos control (C) y desnutrido (D) de ratas macho de 35 días de edad. Los datos muestran la media \pm SEM. Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba <i>post-hoc</i> de Tukey ($F_{15,117}=5.403$). Diferencias significativas entre fibras del mismo fascículo y grupo * $P < 0.05$; **	

P<0.01; *** P<0.001; diferencias significativas entre grupos ° P<0.05; °° P<0.01; °°° P<0.001. N=6, excepto en F4 (D), donde N=5..... 32

Figura 17. Porcentaje de fibras oxidativas (O) y glucolíticas (G) en cada fascículo (A, F2; B, F3; C, F4; y D, F5) del m. *EDL* en los grupos control (C) y desnutrido (D) de ratas macho de 35 días de edad. Los datos muestran la media ± SEM. Diferencias significativas (P≤0.05) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F_{9,80}=21.92). Diferencias significativas entre fibras del mismo fascículo y grupo * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; diferencias significativas entre grupos ° P<0.05; °° P<0.01. N=6..... 34

Figura 18. Los datos muestran la media ± SEM. Diferencias significativas (P≤0.05) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F_{21,156}=4.029). *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001. N=6. 36

Figura 19. Prefactor de forma *a* de las fibras intermedias (I) y rápidas (R) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Línea punteada indica el valor mínimo para considerar comportamiento fractal de los datos. Los datos muestran la media ± SEM. Diferencias significativas (P≤0.05) determinadas con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F2, F_{3,20}=1.66; F3, F_{3,20}=1.55; F5, F_{3,20}=7.12) y Kruskal-Wallis, seguida de una prueba *post-hoc* de Dunn (H₃=3.24). *P<0.05; **P<0.01. N=6, excepto F4 (D), donde N=5..... 38

Figura 20. Parámetro *c* de las fibras intermedias (I) y rápidas (R) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Los datos muestran la media ± SEM. Diferencias significativas (P≤0.05) determinadas con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F2, F_{3,20}=2.85; F3, F_{3,20}=1.50; y F5, F_{3,20}=8.04) y Kruskal-Wallis, seguida de una prueba *post-hoc* de Dunn (F4, H₃=5.76). *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. N=6, excepto F4 (D), donde N=5..... 39

Figura 21. Dimensión fractal de las fibras intermedias (I) y rápidas (R) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Los datos muestran la mediana con los percentiles 25 a 75, así como el valor máximo y el valor mínimo. Diferencias significativas (P≤0.05) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F_{9,78}=2.17). *P<0.05; **P<0.01. N=6, excepto F4 (D), donde N=5. 40

Figura 22. Prefactor de forma *a* de las fibras oxidativas (O) y glucolíticas (G) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Línea punteada indica el valor mínimo para considerar comportamiento fractal de los datos. Los datos muestran la media ± SEM. Diferencias significativas (P≤0.05) determinadas con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F3, F_{3,20}=3.71; F5, F_{3,20}=3.74) y Kruskal-Wallis, seguida de una prueba *post-hoc* de Dunn (F2, H₃=5.86; F4, H₃=1.25). *P<0.05. N=6..... 42

Figura 23. Parámetro *c* de las fibras oxidativas (O) y glucolíticas (G) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Línea punteada indica el valor mínimo para considerar comportamiento fractal de los datos. Los datos muestran la media ± SEM. Diferencias significativas (P≤0.05) determinadas con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F2, F_{3,20}=9.96; F3, F_{3,20}=4.17; F4, F_{3,20}=6.06; F5, F_{3,20}=23.72). *P<0.05; **P<0.01. N=6..... 43

Figura 24. Dimensión fractal las fibras oxidativas (O) y glucolíticas (G) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Los datos muestran la mediana con

los percentiles 25 a 75, así como el valor máximo y el valor mínimo. Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey ($F_{9,80} = 0.83$). $N=6$ 44

Figura 25. Mapas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas en el F2 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas del F2 para los grupos control (C) y desnutrido (D). 46

Figura 26. Mapas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas en el F3 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas del F3 para los grupos control (C) y desnutrido (D). 47

Figura 27. Mapas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas en el F4 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas del F4 para los grupos control (C) y desnutrido (D). 48

Figura 28. Mapas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas en el F5 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas del F5 para los grupos control (C) y desnutrido (D). 49

Figura 29. Mapas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas en el F2 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas del F2 para los grupos control (C) y desnutrido (D). 50

Figura 30. Mapas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas en el F3 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas del F3 para los grupos control (C) y desnutrido (D). 51

Figura 31. Mapas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas en el F4 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas del F4 para los grupos control (C) y desnutrido (D). 52

Figura 32. Mapas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas en el F5 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas del F5 para los grupos control (C) y desnutrido (D). 53

Figura 33. Dirección e intensidad de cambio fenotípico de los tipos de fibras (Lentas L, Intermedias oxidativas IO, Intermedias glucolíticas IG y Rápidas R) en los fascículos (F2, F3, F4 y F5) del m. EDL, en ratas macho de 35 días de edad postnatal, provocado por la desnutrición crónica. En la metodología se describe la elaboración de este diagrama. 58

RESUMEN

En este estudio analizamos el efecto que ejerce la desnutrición crónica sobre la composición, organización y distribución de las fibras en cada uno de los fascículos del músculo *extensor digitorum longus* (m. *EDL*). Se utilizaron dos grupos de ratas macho *Wistar* (*Rattus norvegicus*) de 35 días de edad, control (n=6) y desnutrido (n=6) (50% de la cantidad de alimento con respecto al grupo control). Los protocolos alimentación se mantuvieron desde la gestación, nacimiento, lactancia y hasta el día 35 postnatal. Debido a la desnutrición crónica se espera que se dé una transición de los tipos de fibras a uno tipo intermedio y metabolismo oxidativo, lo cual provocaría que la organización y distribución de las fibras en los fascículos cambiara. A ambos grupos se diseccionaron los fascículos del m. *EDL* (F2, F3, F4, F5), se realizaron cortes seriados transversales de 10 μm de grosor, los cuales se tiñeron con las técnicas de ATPasa (pH 9.4) y NADH-TR para tomar microfotografías de los cortes teñidos (con un objetivo de 10X). De acuerdo a su tinción las fibras se identificaron como: transparentes-lentas; oscuras-intermedias y grises-rápidas o bien, claras-glucolíticas u oscuras-oxidativas. Se identificaron, se contaron y se determinaron las coordenadas X, Y de cada una de las fibras por fascículo para construir imágenes binarias de su posición y su proporción relativa. Tanto el método de correlación integral fractal y la función de distribución de densidad fueron empleados para establecer el grado de organización y los patrones de distribución de las fibras musculares. Los resultados obtenidos indican que los fascículos presentan porcentajes de los tipos diferentes, mientras los F2, F3 y F4 presentan mayor porcentaje de fibras intermedias, el F5 posee un mayor porcentaje de fibras rápidas; en cuanto al metabolismo, los fascículos presentan mayor porcentaje de fibras con metabolismo glucolítico; excepto en el F2. La desnutrición crónica provoca el decremento del porcentaje de fibras rápidas en los F3 ($F_{2,30}=8.05$; $P<0.05$) y F5 ($F_{2,30}=22.49$; $P<0.001$), así como de las fibras intermedias en el F4 ($F_{2,27}=8.38$; $P<0.05$) y un aumento de estas últimas en el F5 ($F_{2,30}=22.49$; $P<0.001$); el metabolismo se vio alterado en el F3, aumentando las fibras oxidativas ($F_{2,20}=25.43$; $P<0.01$) con el respectivo decremento de fibras glucolíticas ($F_{2,20}=25.43$; $P<0.01$). El análisis fractal mostró que las fibras rápidas e intermedias, así como las fibras oxidativas y glucolíticas presentan organización fractal ($D>1.0$), implicando que las fibras presentan una organización determinada en los fascículos, lo cual puede estar relacionado con la función de éstos; las fibras lentas, debido a su bajo número no fue posible analizarlas. Esta organización se ve afectada sólo en las fibras rápidas del F3 ($F_{3,20}=5.56$; $P<0.05$). Los patrones de distribución de los tipos

de fibras es diferente en cada fascículo y se ven alterados en los F3 y F4, para la técnica de ATPasa (pH 9.4); las fibras clasificadas por NADH-TR no se ven alterados los patrones, pero sí la densidad de fibras por cuadrante. Todos estos resultados sugieren que la desnutrición crónica ejerce un efecto diferencial sobre los fascículos del m. *EDL*, tanto en la composición, organización y distribución de las fibras, lo cual podrían tener repercusiones sobre la función de cada uno de ellos y del músculo en su totalidad.

1. INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético está conformado de células multinucleadas, denominadas fibras musculares o miofibras, las cuales, generalmente se clasifican en lentas (Tipo I), intermedias (Tipo IIa) y rápidas (Tipo IIb), por sus características estructurales, bioquímicas y funcionales. Éstas se encuentran en distintas proporciones en cada músculo, lo que les confiere una gran heterogeneidad (Schiaffino y Reggiani, 2011). Las fibras lentas (Tipo I) se caracterizan por ser resistentes a la fatiga, ejercen poca fuerza contráctil y son de metabolismo oxidativo; las fibras rápidas (Tipo IIb) son fatigables, producen gran fuerza contráctil y tienen metabolismo glucolítico; mientras que las fibras intermedias (Tipo IIa) desarrollan alta fuerza contráctil y son resistentes a la fatiga, y presentan un metabolismo mixto (Blaauw *et al.*, 2013). El tipo de fibras que constituyen a un músculo varía a lo largo de la vida (Lehnert *et al.*, 2007), esto gracias a la plasticidad que presenta este tejido, la cual permite que una fibra modifique su fenotipo en respuesta a factores internos o externos, como el ejercicio (Röckl *et al.*, 2007), variaciones hormonales o el estado nutricional, entre otros (Matsakas y Patel, 2009).

La desnutrición crónica, la cual se ha convertido en un grave problema de salud a nivel mundial, causando la muerte de 3.1 millones de niños cada año (OMS, 2015). De acuerdo con Guerrant *et al.* (2013), esta clase de desnutrición forma un círculo vicioso con las enfermedades entéricas, causando lo que denominan “doble carga”, debido a que no puede tratarse un síntoma sin desatender el otro. Sumando a lo anterior, otros problemas nutricionales importantes como la obesidad conforman la “triple carga”, lo cual vuelve aún más complicado su tratamiento.

Algunos individuos con problemas nutricionales, no cuentan con los suficientes nutrientes para que tengan un desarrollo adecuado en las etapas embrión/feto/niño, lo que conlleva a diversas alteraciones en los órganos y sistemas, en particular la tiroides (Ayala-Moreno *et al.*, 2013), timo (Savino, 2002) y el metabolismo en general (Emery, 2005). Uno de los tejidos con mayor actividad metabólica es el músculo esquelético, por lo que resulta altamente afectado por una alimentación deficiente en calidad o cantidad, además es un tejido dependiente de la nutrición materna durante el desarrollo embrionario, afectándose el número y composición de las fibras musculares debido a la desnutrición, lo cual conlleva a sufrir alteraciones fisiológicas a largo plazo (Zhu *et al.*, 2006).

Uno de los modelos animales más utilizados para analizar el efecto de diferentes estados nutricionales, es el músculo esquelético de la rata, siendo particularmente el músculo *extensor digitorum longus* (m. *EDL*) el más empleado. Este músculo se considera de contracción rápida y se localiza lateral al m. tibial anterior, surge desde los dos tercios antero-superiores de la fíbula, membrana interósea y parte superior de la articulación tibiofibular, insertándose en las falanges de los cuatro dedos (índice a meñique) de la pata posterior. Su inervación es dada por el nervio peroneo profundo y su función es extender cada uno de los dedos de la pata, así como el tobillo (Whitaker y Borley, 2010). El movimiento de los dedos es completamente independiente gracias a que el m. *EDL* se subdivide en cuatro fascículos (F2, F3, F4 y F5) (Balice-Gordon y Thompson, 1988) bien definidos y delimitados. En la rata *Wistar* adulta, el m. *EDL* presenta $3.7\pm 0.7\%$ de fibras del Tipo I y $0.1\pm 0.1\%$ del tipo I/IIa; $20.0\pm 1.5\%$ de fibras del tipo IIa; $4.0\pm 0.6\%$ de fibras del tipo IIax; mientras que el $72.1\pm 4.6\%$ son tipo IIb/IIx, de las cuales $35.9\pm 2.8\%$ de fibras son exclusivamente fibras rápidas (Tipo IIb) (Bloemberg y Quadrilatero, 2012) y contiene cerca de 40 unidades motoras con un tiempo promedio de contracción de 11 ms (Close, 1967).

Se ha demostrado que la desnutrición provoca atrofia del m. *EDL* y provoca la disminución de la contracción máxima y tensión tetánica y que la desnutrición es un factor que altera la plasticidad muscular, así como aumento en la velocidad de acortamiento y alteraciones en los fenotipos de las fibras musculares, lo cual puede comprometer la locomoción del individuo (Toscano *et al.*, 2008); sin embargo, Pereyra-Venegas *et al.*, (2015) hallaron que la desnutrición crónica provocó (sólo en los machos) una mayor fuerza normalizada, tanto en la contracción muscular, como en la respuesta tetánica isométrica. En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, mostramos que la desnutrición crónica induce un incremento en el porcentaje de fibras que presentan metabolismo oxidativo y una disminución en el porcentaje de fibras con metabolismo glucolítico, a su vez, incrementa el porcentaje de fibras intermedias (tipo IIa/IIc) y reduce el de las fibras rápidas (IIb) (sin embargo, véase Pereyra-Venegas *et al.*, 2015, quienes observaron un aumento de fibras rápidas desde los 20 hasta los 365 días postnatales, excepto en las hembras), sin afectar aparentemente el número de fibras lentas; ocurriendo los cambios más significativos entre los 21 y 45 días postnatales (Ruíz-Rosado *et al.* 2013). La mayoría de los trabajos han utilizado al m. *EDL* completo para su muestreo; sin embargo, dada la variabilidad en tamaño (longitud y ancho) de cada uno de los fascículos que lo conforman, así como la función de éstos, en este trabajo se analizará el efecto de la desnutrición crónica sobre la estructura, organización y composición de las

fibras musculares, de cada uno de los fascículos (F2, F3, F4 y F5) del m. *EDL* en ratas machos *Wistar* de 35 días edad postnatal. Para esto, se utilizaron las técnicas histoenzimáticas de ATPasa alcalina (pH 9.4) y NADH-TR, para determinar la actividad de la ATPasa de las cadenas pesadas de miosinas (lenta, intermedia o rápida), así como su metabolismo (glucolítico u oxidativo), respectivamente. También, se analizó si las fibras musculares poseen una distribución azarosa o fractal mediante el método de correlación integral fractal y con la aplicación de la función de distribución se determinaron los patrones de distribución de las fibras de cada fascículo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Músculo

Los vertebrados, así como muchos otros organismos, desarrollan dos conductas fundamentales: 1) mantener su estructura y funcionamiento; y 2) reproducirse (Bourges-Rodríguez, 2008). Para llevar a cabo tales conductas, presentan en común el movimiento, el cual es generado por los músculos esqueléticos.

En general, el músculo se clasifica en: liso y estriado. El músculo liso se subdivide en unitario o visceral y multiunitario; y el estriado a su vez en cardíaco y esquelético. Todos los tipos de músculo tienen en común el mismo mecanismo molecular de contracción de actina-miosina y la activación eléctrica provocada por un aumento de Ca^{2+} intracelular (Hill y Olson, 2012). Las características distintivas de cada tipo de músculo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los distintos tipos de músculos. Basada en Sherwood (2014) y Patton y Thibodeau (2015).

Característica	Liso		Estriado	
	Unitario o visceral	Multiunitario	Cardíaco	Esquelético
Principal ubicación	Paredes de varios órganos huecos	Paredes de varios órganos huecos	Paredes del corazón	Unido a huesos
Principal función	Movimiento de las paredes	Movimiento de las paredes	Bombear sangre	Locomoción, producción de calor y postura
Estriación	No	No	Sí	Sí
Núcleo	Uno, cerca del centro de la célula	Uno, cerca del centro de la célula	Uno (en ocasiones dos) cerca del centro de la célula	Varios, cerca del sarcolema

Continuación de Tabla 1.

Característica	Liso		Estriado	
	Unitario o visceral	Multiunitario	Cardiaco	Esquelético
Túbulos T	No	No	Gran diámetro, forma díadas con el retículo sarcoplásmico, regula la entrada de Ca^{2+} al sarcoplasma	Delgados, forman triadas con el retículo sarcoplásmico
Filamentos de actina y miosina	Sí	Sí	Sí	Sí
Troponina y tropomiosina	Sólo tropomiosina	Sólo tropomiosina	Sí	Sí
Inervación	Sistema nervioso autónomo	Sistema nervioso autónomo	Sistema nervioso autónomo	Sistema nervioso somático
Nivel de control	Involuntario	Involuntario	Involuntario	Voluntario y regulación subconsciente
Iniciación de la contracción	Miogénico (potenciales de marcapasos y potenciales de ondas lentas)	Neurogénico	Miogénico (potenciales de marcapasos)	Neurogénico
Rol de estímulos nerviosos	Modifica la contracción; puede excitar o inhibir; contribuye a la gradación	Inicia la contracción; contribuye a la gradación	Modifica la contracción; puede excitar o inhibir; contribuye a la gradación	Inicia la contracción; contribuye a la gradación
Mecanismo de acción de Ca^{2+} para permitir la unión actina y miosina	Químicamente provoca la fosforilación de la miosina en filamentos gruesos de modo que se puede unir con la actina	Químicamente provoca la fosforilación de la miosina en filamentos gruesos de modo que se puede unir con la actina	Reposición físicamente el complejo troponina-tropomiosina en los filamentos delgados para dejar descubiertos los sitios de unión de actina	Reposiciona físicamente el complejo troponina-tropomiosina en los filamentos delgados para dejar descubiertos los sitios de unión de actina
Uniones gap	Sí	Muy pocas	Sí	No
Velocidad de contracción	Muy lenta	Muy lenta	Lenta	Rápida o lenta, depende del tipo de fibras
Relación longitud-tensión bien definida	No	No	Sí	Sí

2.1.1. Músculo esquelético

El músculo esquelético está conformado de haces de células musculares largas y cilíndricas, también llamadas fibras musculares, las cuales están rodeadas por tejido conectivo, denominado endomisio, perimisio y epimisio (desde su parte más interna hasta su parte más externa) que le brinda elasticidad al músculo (Fig. 1). Asimismo, el tejido conectivo se encuentra formando los tendones, que ayudan a transferir la fuerza producida por el músculo al esqueleto. Los músculos pequeños tienen sólo unos cientos de fibras (ej. el músculo tensor del tímpano); mientras que varios músculos grandes, tales como los de las extremidades pueden tener varios miles de fibras. Cada fibra muscular puede ser tan larga como 30 cm y tener un diámetro de entre 10 a 100 μm (MacIntosh *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2012).

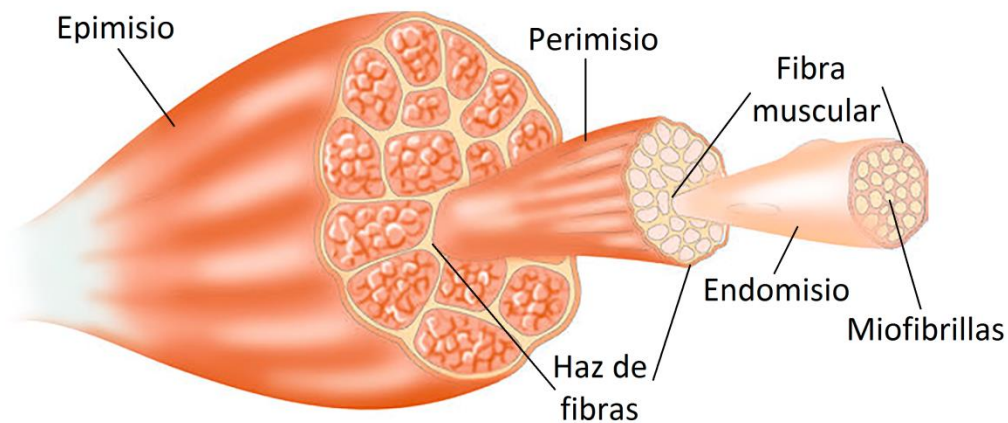


Figura 1. Conformación del músculo esquelético. Modificado de Hill *et al.* (2012).

Las fibras musculares están mayormente constituidas por miofilamentos que contiene cilindros denominados miofibrillas, dispuestas en sentido longitudinal, con un grosor de $\sim 1\mu\text{m}$. Cada miofibrilla muestra una estriación transversal, debida a la alternancia de distintas estructuras proteicas. Con el microscopio de luz se observan bandas claras y oscuras, denominadas bandas I y A, respectivamente. Dentro de la banda I se nota una división en el centro, la línea o disco Z; mientras que en el centro de la banda A está una la banda H, dentro de la cual, en el centro, se localiza la línea M, en la que se unen los filamentos de miosina (Fig. 2) (Paniagua, 2007; Welsch, 2008).

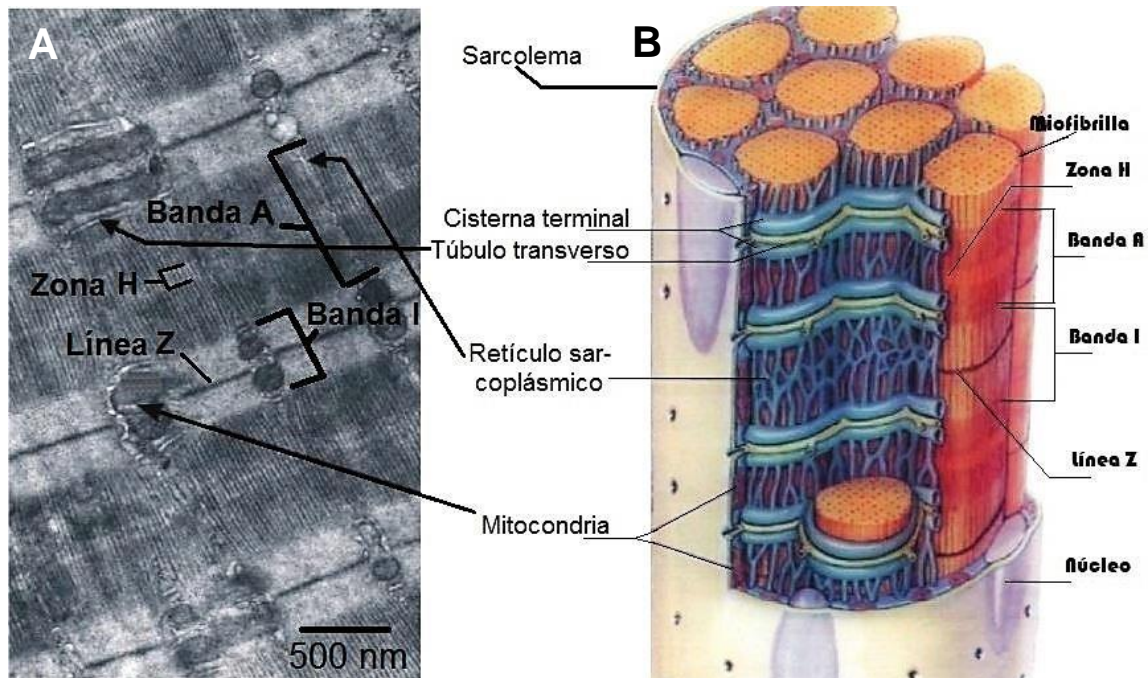


Figura 2. Microfotografía (A) y representación esquemática (B) de las principales estructuras las fibras musculares. Modificado de Pilla (2012).

La región comprendida entre dos líneas Z, se le denomina sarcómera, la cual es la unidad fisiológica fundamental de la contracción muscular, que tiene un longitud aproximadamente de 2.2 μm en una fibra relajada (MacIntosh *et al.*, 2006). Dentro de cada sarcómera se pueden distinguir cuatro conjuntos moleculares: miofilamentos delgados, miofilamentos gruesos, línea Z y línea M. Las miofibrillas se componen esencialmente de cuatro tipos de proteínas: miosina, actina, tropomiosina y troponina (Patton y Thibodeau, 2015). Más específicamente, los miofilamentos delgados están conformados por actina (α), tropomiosina (α y β), troponina (C, T e I), la proteína de coronación y tropomodulina (estas dos últimas son las encargadas del crecimiento de cada filamento delgado). Los miofilamentos gruesos se componen de miosina (cadena pesada y cadena ligera y de unión de proteína C) y titina (larga y corta). La línea Z posee actina (α), FATZ o calsarcina (1, 2 y 3), proteína ZASP, miotilina, paladina, miopaladina, FHL1, cristalina αB y proteínas LIM de músculo. Finalmente, la banda M está integrada por miosesina (1, 2 y 3), demás, se puede encontrar nebulina (en la línea I) y la distrofina (Kijowski, 2001; Paniagua, 2007; Luther, 2009; Schiaffino y Reggiani, 2011).

2.1.2. Clasificación de las fibras musculares

Las fibras musculares deben su diversidad a la presencia de las distintas isoformas de miosina. Todas las miosinas constituyen una gran superfamilia de proteínas que tienen en común un dominio que interactúa con la actina, hidroliza el ATP y produce movimiento a través de mecanismo de puentes cruzados; se componen de una o dos cadenas pesadas y varias cadenas ligeras. Cada cadena pesada de miosina (MHC, por sus siglas en inglés) presenta tres subdominios funcionales y estructurales: cabeza, cuello y cola. En la porción N-terminal se encuentra la cabeza, también denominada dominio motor, que contiene los sitios de unión a actina y ATP y es la región más conservada entre las diferentes isoformas. Mientras que en la porción C-terminal está el dominio del cuello, el cual es una región α -helicoidal, que se asocia a las cadenas ligeras o cadmodulinas. Posterior al cuello se localiza el dominio de la cola, que contiene los sitios de unión que determinan la actividad particular de una miosina, además sirve de ancla y posiciona al dominio motor para interactuar con la actina (Fig. 3) (Schiaffino y Reggiani, 1994; Sellers, 2000; Lodish *et al.*, 2012).

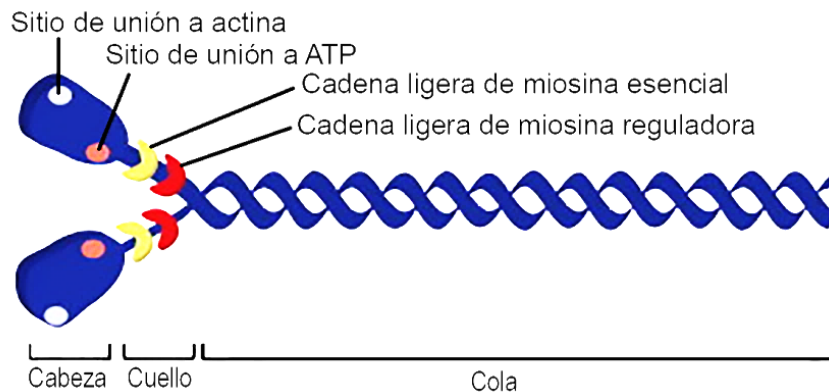


Figura 3. Estructura de las cadenas pesadas de miosina. Modificada de Quintin *et al.* (2008).

Dentro de los mamíferos, se han descubierto 14 genes que codifican MHC, de las cuales, seis son exclusivos de músculo esquelético: MYH13 (musculatura extraocular), MYH8 y MYH3 (músculo en desarrollo), MYH4 (fibras rápidas, IIb), MYH1 (fibras rápidas, 2x) y MYH2 (fibras intermedias, IIa); dos son de músculo cardíaco, aunque presentes también en músculo esquelético: MYH6 (corazón y músculo de la mandíbula) y MYH7 (corazón y fibras lentas), el resto se transcribe en diversos músculos: MYH7b o MYH14 (corazón, músculo extraocular y fibras lentas), MYH15 (capa orbital de los músculos

extraoculares), MYH16 (músculo de la mandíbula, en carnívoros) (Rossi *et al.*, 2010; Schiaffino y Reggiani, 2011).

Dependiendo de las propiedades analizadas (metabólicas, estructurales, contráctiles, entre otras), se han establecido diversas clasificaciones para las fibras musculares (Pette y Staron, 2001). La más utilizada se basa en la actividad de la ATPasa de las cadenas pesadas de miosina, en la cual se ha encontrado una relación entre la intensidad de la tinción con las isoformas de las MHC (Pette y Staron, 1997) y, por lo tanto, de la velocidad de contracción (Bárány, 1967). Generalmente, se realiza con pH ácido o pH alcalino y dependiendo de la intensidad de la tinción se clasifican en lentas (tipo I), intermedias (tipo IIa) y rápidas (tipo IIb) (Guth y Samaha, 1970).

Otra clasificación se realiza con la caracterización del metabolismo utilizando enzimas de la cadena respiratoria como NADH tetrazolio reductasa (Nachlas *et al.*, 1958), citocromo C oxidasa (Seligman *et al.*, 1968) y succinato deshidrogenasa (Nachlas *et al.*, 1957). Asimismo, se han desarrollado diversas técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales a las cuatro principales isoformas de MHC (ej. Bloemberg y Quadrilatero, 2012).

Las características generales de los tipos de fibras musculares se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características contráctiles, actividad enzimática y propiedades morfológicas y metabólicas de los tipos de fibras del músculo esquelético. Modificado de Zierath y Hawley (2004).

	Lentas (Tipo I)	Intermedias (Tipo IIa)	Rápidas (Tipo IIb)
Características contráctiles			
Tiempo para alcanzar el pico de tensión	1.0	0.4	0.4
Ca ²⁺ ATPasa de la miosina	1.0	3.0	3.0
Mg ²⁺ ATPasa de la actomiosina	1.0	2.8	2.8
Actividad enzimática			
Creatinina fosfoquinasa	1.0	1.3	1.3
Fosfofructoquinasa	1.0	1.5	2.1
Glucógeno fosfoquinasa	1.0	2.1	3.1
Citrato sintasa	1.0	0.8	0.6

Continuación de Tabla 2.

	Lentas (Tipo I)	Intermedias (Tipo IIa)	Rápidas (Tipo IIb)
Propiedades morfológicas			
Densidad de capilares	1.0	0.8	0.6
Densidad mitocondrial	1.0	0.7	0.4
Propiedades metabólicas			
Potencial oxidativo	1.0	0.7	0.2
Potencial glucolítico	1.0	1.5	2.0
Fosfocreatina	1.0	1.2	1.2
Glucógeno	1.0	1.3	1.5
Triacilglicerol	1.0	0.4	0.2

Todos los valores están expresados como veces de cambio relativo a las fibras lentas.

2.2. Plasticidad del músculo esquelético

La plasticidad muscular es un mecanismo que permite al músculo adaptarse a diversas condiciones internas o externas durante toda la vida. En general, la plasticidad se da en dos formas, cambiando el fenotipo (hacia fibras rápidas o hacia fibras lentas) o el área de las fibras musculares (Fig. 4) (Blaauw *et al.* 2013).

De acuerdo con Schiaffino y Reggiani (2011), la plasticidad muscular se puede dividir en cinco modelos básicos:

- 1) Patrones de descarga de las neuronas motoras o estimulación eléctrica (ej. Buller *et al.*, 1960; Gutmann y Zelena, 1962; Midrio *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1992);
- 2) Sobrecarga y descarga (ej. Jamali *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2003; Bagley *et al.*, 2012);
- 3) Actividad e inactividad (ej. Harlow *et al.*, 2001; Borina *et al.*, 2010; Luden *et al.*, 2012);
- 4) Regulación hormonal (ej. Izumo *et al.*, 1986; Polla *et al.*, 2001; Tiidus, 2011); y
- 5) Oxígeno y disponibilidad de sustrato (ej. Hoppeler *et al.*, 2003; Matsakas y Patel, 2009; Parada-Simão *et al.*, 2011).

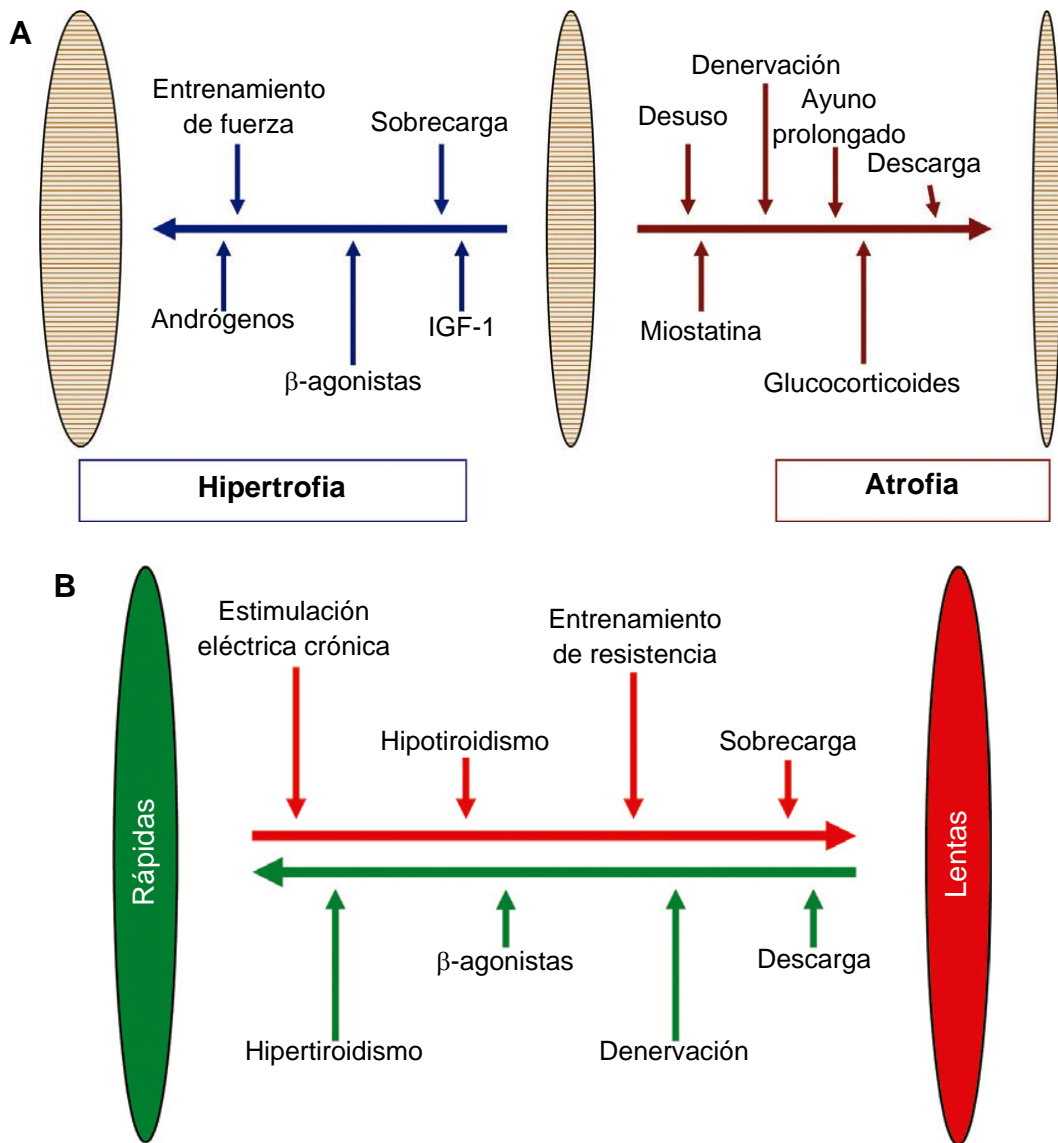


Figura 4. Principales factores que modifican el tamaño (A) y el fenotipo (B) de las fibras musculares. Modificado de Blaauw, *et al.* (2013).

La forma en que más se ha estudiado la plasticidad muscular es con los cambios fenotípicos de las fibras, las cuales se cambian de acuerdo a la regla del “vecino más cercano”, es decir, de lentas (I) a rápidas (II) o de rápidas (II) a lentas (I) (I \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIIX/IID \leftrightarrow IIIB) (Termin *et al.*, 1989; Ausoni *et al.*, 1990, Pette *et al.*, 1999; Pette y Staron; 2001). Además, los cambios en la transición de las fibras es debida al tipo de fibras presentes de forma natural en los músculos, así como a características intrínsecas de cada uno de ellos, que lo vuelven más o menos sensibles a un factor intrínseco (p. ej. alteraciones hormonales) o extrínsecos (p. ej. desnutrición), que los limitan a cierto rango

de cambio. Lo cual es la explicación a que bajo un mismo factor, un músculo responda hacia una sentido, mientras que otro músculo lo haga en sentido opuesto (Blaauw *et al.*, 2013).

2.3. Efectos de la nutrición sobre el músculo esquelético

Diversos estudios han propuesto una relación entre el ambiente fetal (incluyendo la nutrición) y la salud postnatal. Principalmente, se ha observado que los estados nutricional y hormonal durante la gestación pueden causar alteraciones en el desarrollo subsecuente (Satterfield *et al.*, 2011), los cuales pueden estar asociados con cambios en la maquinaria epigenética mediante un proceso llamado programación fetal (p. ej. metilación del DNA, modificación en las histonas por acetilación, compactación y relajación de la cromatina, impronta genética y el perfil de los miRNA) (Fig. 5) (Lucas, 1998; Verma, 2011). Tal programación fetal es definida como un proceso adaptativo mediante el cual la nutrición y otros factores ambientales pueden alterar rutas del desarrollo durante el periodo crítico del crecimiento prenatal, y por lo tanto, inducir a cambios en el metabolismo postnatal generando susceptibilidad a enfermedades crónicas (Wu *et al.*, 2004).

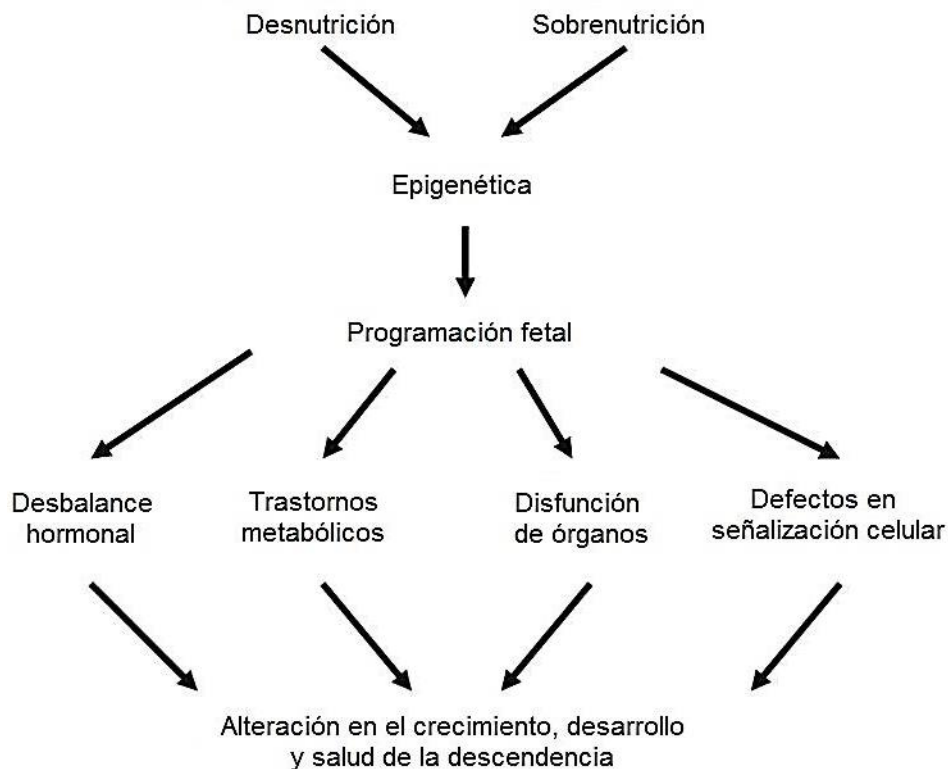


Figura 5. Estados nutricionales afectando la epigenética, mediante la programación fetal. Modificado de Satterfield *et al.* (2011).

La desnutrición es un desequilibrio entre el suministro de nutrientes del cuerpo y la demanda de crecimiento del mismo, su mantenimiento y actividades específicas (Roure, 2010), la cual puede ser por una insuficiente ingesta de alimento o consecuencia de diversas enfermedades (UNICEF, 2006). En general, la desnutrición puede clasificarse en dos tipos: retraso en el crecimiento y desbalance de micronutrientes. La primera puede ser aguda o crónica; mientras que la segunda puede ser la deficiencia de algún micronutriente (p. ej. vitamina A, hierro, yodo, etc.). La desnutrición aguda, se caracteriza por un deterioro rápido del estado nutricional en un corto periodo de tiempo; de ésta existen tres tipos: marasmo (severa pérdida de peso), kwashiorkor (edemas bilaterales por retención de agua) y kwashiorkor marásmico (una mezcla de ambos tipos). La desnutrición crónica, también llamada retraso en el crecimiento (*stunting*), comienza antes del nacimiento y es causada por una pobre nutrición materna, prácticas inadecuadas de alimentación y baja calidad de los alimentos, así como algunas infecciones. Se estima que 800 millones de personas en el mundo sufren de este tipo de desnutrición (Fig. 6) (Shetty, 2003; UNICEF, 2015).

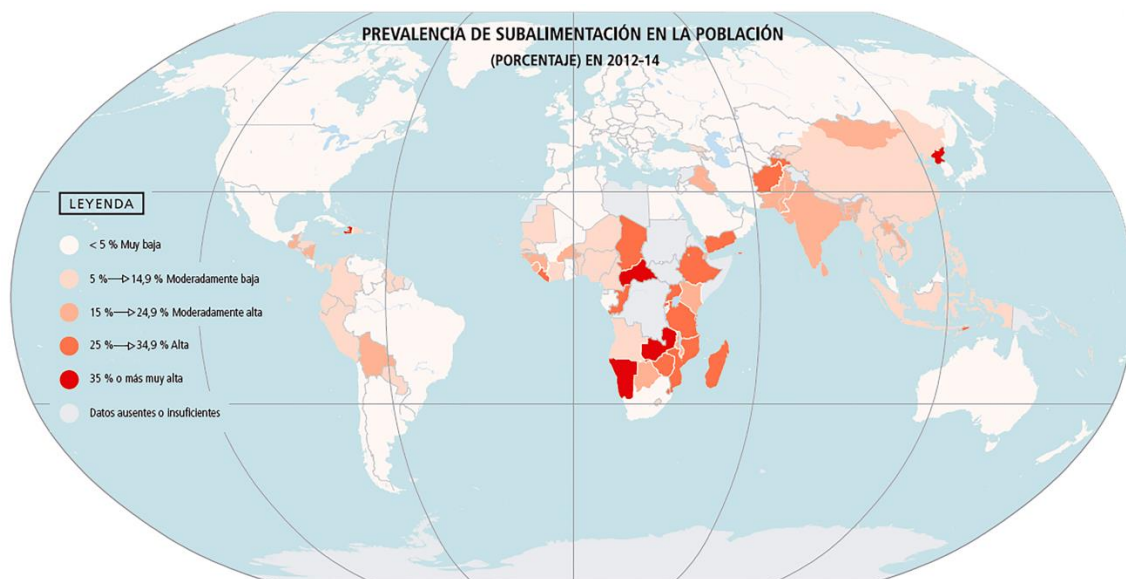


Figura 6. Mapa de prevalencia de desnutrición en el mundo. Tomado de FAO (2015).

Durante el desarrollo, la desnutrición puede presentarse en diferentes etapas: prenatal (gestación), perinatal (gestación y lactancia), postnatal temprana (primeros años)

o tardía (etapa adulta) y crónica. Se ha observado que entre más temprana ocurra, sus efectos son persistentes, por lo que se ha recomendado que el periodo para prevenir la desnutrición es el embarazo y los dos primeros años de vida del niño (Wisbaum, 2011).

Debido a la composición molecular del músculo esquelético, predominantemente de proteínas, ha sido observado que algunas propiedades de éste son dependientes del grado de nutrición (Saunders *et al.*, 2014), como lo es el área de la sección transversal y la proporción de los tipos de fibras (lentas, intermedias y rápidas) (Yamaguchi *et al.* 1993) durante la vida postnatal de los individuos. Se ha observado que una desnutrición aguda de 48 horas provoca en el músculo esquelético un decremento en los niveles de PGC1 α y de FOXO1 fosforilado, ambos reguladores del fenotipo de las fibras (Mitzunoya *et al.*, 2013).

Sin embargo, los efectos de la nutrición son más relevantes durante el desarrollo perinatal, puesto que la desnutrición modifica las propiedades enzimáticas de manera dependiente al tipo de fibra, generalmente aumentando el metabolismo oxidativo mediante una mayor translocación de ácidos grasos, los cuales no son usados para generar energía, por lo que se acumulan provocando desechos tóxicos para la mitocondria (da Silva *et al.*, 2014). En las fibras rápidas, donde ocurre atrofia debido a la desnutrición, ésta se relaciona con una menor expresión de genes asociados con proteínas estructurales del músculo como ACTA1 (actina α), TPM2 (tropomiosina), así como de enzimas metabólicas ATP1A2 (ATPasa) y CKM (creatina quinasa) (Lehnert *et al.*, 2006), asimismo, en este tipo de fibras ocurre una baja expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo (Hou *et al.*, 2013) y un aumento en la expresión de genes relacionados con el metabolismo glucolítico (da Silva *et al.*, 2014). Igualmente, la desnutrición temprana postnatal retrasa la madurez contráctil, metabólica y la aparición de la isoforma de MHC IIb (Lefaucheur *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2008), disminuyen los transportadores de glucosa GLUT-4, la actividad de CPT-1 (enzima encargada del transporte de ácidos grasos de cadena larga) y se disminuye la función de enzimas mitocondriales, entre las que se encuentran algunas asociadas al metabolismo glucolítico (Zhu *et al.*, 2006), Igualmente, se han observado alteraciones en las membranas de los túbulos transversos, con una sobreexpresión de GLUT-4, lo cual provoca que se modifique la estabilidad conformacional de proteínas integrales, esto aunado con un aumento en fuerza y en resistencia a la fatiga (Ramírez-Oseguera *et al.*, 2013).

Además, la desnutrición perinatal también disminuye la frecuencia de precursores de músculo esquelético (SMP, por sus siglas en inglés), lo cual conlleva a una menor y más tardada recuperación cuando existe alguna lesión (Woo *et al.*, 2011). Estas alteraciones en el metabolismo pueden ser asociadas con la presencia de enfermedades y padecimientos como la diabetes, obesidad y síndrome metabólico durante la vida adulta (Ramírez-Oseguera *et al.*, 2013; véase también a Pereyra-Venegas *et al.*, 2015).

El músculo *extensor digitorum longus* ocupa la parte fibular del compartimento anterior anterolateral de la pierna (Bianchi y Martinoli, 2007). Este músculo penniforme surge del cóndilo lateral de la tibia, la superficie anterior de la fíbula, el septo intermuscular (entre éste y el músculo tibial anterior y el *peroneus longus*) y la fascia crural cerca de la tibia (Fig. 7 A). El tendón comienza cerca de la mitad de la pierna y recibe fibras casi hasta del tobillo (Travell y Simons, 1993; Lannotti y Parker, 2013). Se divide en cuatro fascículos bien delimitados (Fig. 7 B), cada uno presenta un tendón que se desliza bajo al *extensor retinaculum* y se inserta en la cara dorsal de las falanges media y distal de los dedos de la pata 2-5 (Balice-Gordon y Thompson, 1988). La función del músculo completo es extender los dedos 2 a 5 de la pata (cada uno por un fascículo distinto) y asistir en la dorsiflexión del tobillo (McAtee y Charland, 2007); sin embargo, no se ha establecido un funcionamiento diferencial de los fascículos, que podría relacionarse a otros comportamientos, como el acicalamiento o el rascado.

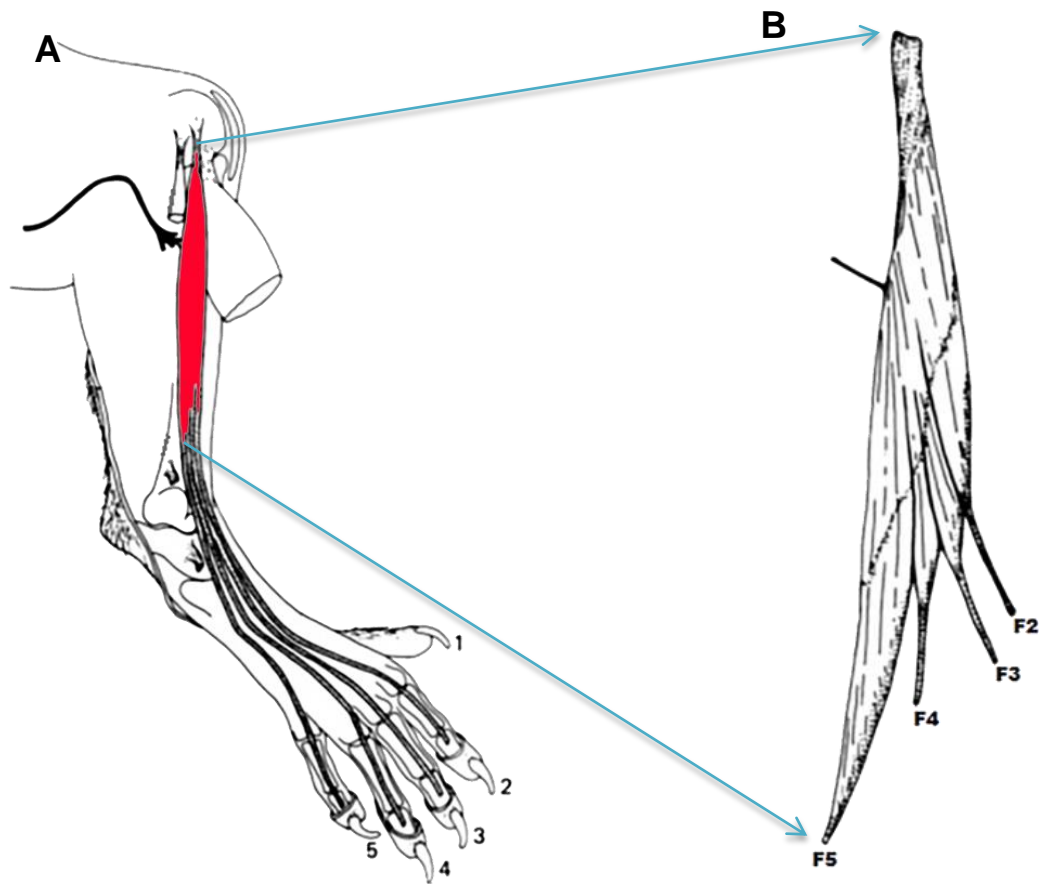


Figura 7. A. Ubicación anatómica del músculo *extensor digitorum longus*. B. Fascículos que conforman al músculo *extensor digitorum longus* (F2-F5) en la rata *Wistar*. Modificado de Balice-Gordon y Thompson (1988).

En este músculo se han observado además de los cambios enzimáticos, cambios en receptores a glucosa y diversas propiedades contráctiles debidos a la desnutrición pre- y perinatal, modificaciones en las proporciones de los tipos de fibras, ocurriendo un aumento en fibras rápidas (Toscano *et al.*, 2008; Pereyra-Venegas *et al.*, 2015), intermedias y oxidativas (Ruíz-Rosado *et al.*, 2013; da Silva *et al.* 2014). Aunque también la desnutrición aguda aumenta los niveles de isoformas de MHC tipo II (Mitzunoya *et al.*, 2013).

2.4. Geometría fractal

Desde tiempos muy remotos la ciencia y las matemáticas se han ido desarrollando a la par, siendo las matemáticas usadas para describir y, en ocasiones, para explicar los fenómenos de la naturaleza. Sin embargo, existen varios fenómenos considerados muy

irregulares o complejos para las matemáticas tradicionales. Si bien el desarrollo del cálculo por Newton y Leibniz en el siglo XVII fue un gran avance, no fue sino hasta 1982 con Benoît Mandelbrot en su libro de “La geometría fractal de la naturaleza” donde hace notar que la geometría tradicional o euclidiana no es aplicable a fenómenos de la naturaleza, física, biología, finanzas, entre otras áreas; a lo cual él acuñó el término fractal para referirse a toda clase de objetos irregulares (Falconer, 2013), quebradizos o geoméricamente fragmentados que pueden ser subdivididos en partes, cada una de las cuales (al menos aproximadamente) es una copia más pequeña del todo, lo que quiere decir que son autosimilares e independientes de la escala (Thomas *et al.*, 2012). Sin embargo, Talanquer (2011) destaca lo siguiente “... los fractales de la naturaleza sólo son autosimilares en sentido estadístico, esto es, si se toma un conjunto suficientemente grande de objetos de la misma clase y se aplican una porción de ellos, es posible que no sea idéntico al original, pero seguramente sí será similar a algún otro miembro de la colección”.

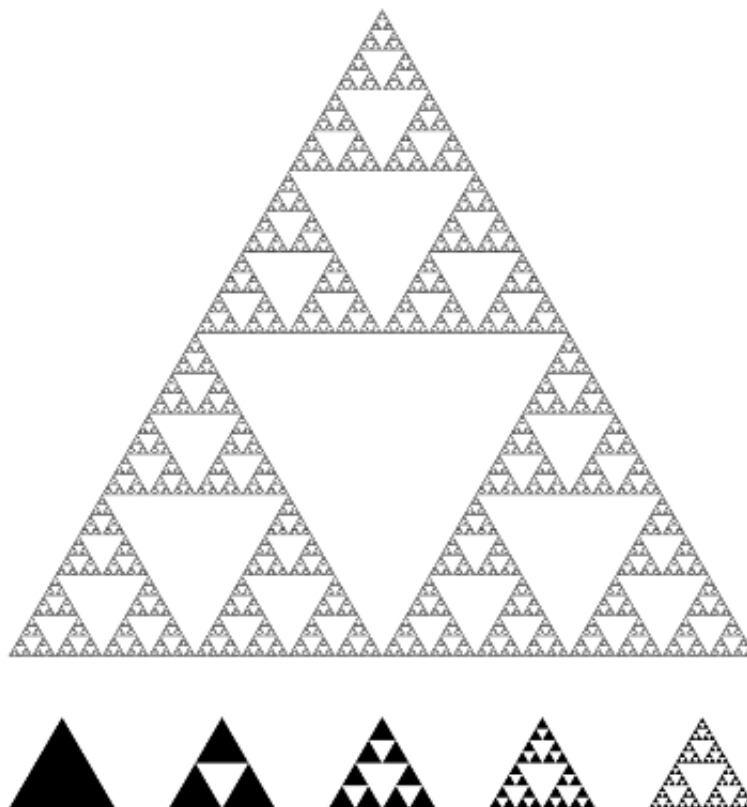


Figura 8. Triángulo de Sierpiński, uno de los fractales más representativos, el cual resulta de dos formas: 1) dividir un triángulo equilátero en cuatro y descartar la pieza central y seguir así en cada uno de los triángulos restantes; y 2) ir formando grupos de tres triángulos, los cuales se van agrupando con otros, formando supergrupos y así indefinidamente. Tomado de Baird (2011).

Los fractales rompen las reglas básicas de la geometría tradicional: las formas pueden tener un perímetro infinito y cero área o volumen; o infinito detalle y la longitud de una línea depende de cuán cerca se observe. Asimismo, se pueden ramificar, dividir, agrupar, girar, rotar, distorsionar, replicar, entre otras acciones (Baird, 2011).

Además de la autosimilitud, la dimensión (i.e. cuánto espacio ocupa un conjunto cerca de cada uno de sus puntos) es un punto central en la geometría fractal. La dimensión fractal siempre es un número real no negativo (ej. 2.03, 1.9, 1.45) (Tang, 2012). Existe una amplia variedad de dimensiones fractales (p.ej. ver Klinkenberg, 1994; Annadhasan, 2012), la dimensión de Hausdorff es una de las más importantes, pero tiene la desventaja de ser complicada de calcular o estimar por métodos computacionales (Falconer, 2003).

2.4.1. Aplicaciones en biología

Desde muy temprano en la biología existió la problemática de no poder hacer análisis precisos a los organismos debido a que las matemáticas tradicionales no permitían estudiar la complejidad total de la naturaleza y con el surgimiento de la geometría fractal a muchos les pareció un mejor enfoque, pues preferían a una “vaca fractal” que a una “vaca esférica”, haciendo referencia a que los fractales les permitirían entender mejor la naturaleza, teniendo en cuenta que ésta siempre será más compleja que las abstracciones matemáticas (Buldyrev, 2009). Un método común utilizado en biología (y otras áreas) es el conteo de cajas o *box-counting*; sin embargo, este tiene el problema de que los objetos biológicos reales no poseen muchos ordenes de autosimilitud, es decir, son relativamente simples, pero para esto se han establecido limitaciones a este método y se han propuestos métodos alternativos (Bisoi y Mishra, 2001).

Ejemplos clásicos de fractales en los sistemas biológicos se encuentran en las ramas de los árboles, frondas de los helechos, los alvéolos pulmonares, el sistema cardiovascular, entre otros (Fig. 9).

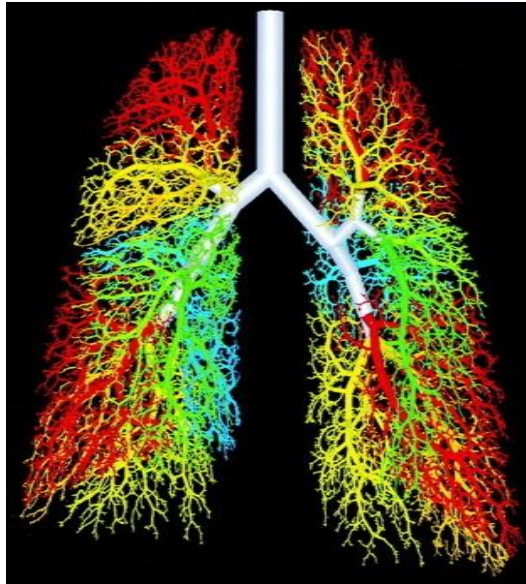


Figura 9. Representación tridimensional de los alvéolos pulmonares, los cuales presentan una organización fractal. Los distintos colores representan a los distintos grupos que conforman a los pulmones. Tomado de Kitaoka *et al.* (1999).

Los análisis fractales han permitido establecer que las membranas celulares y de los orgánulos y la cromatina presentan propiedades fractales, lo cual permite entender mejor el comportamiento celular, así como la diagnosis y prognosis de varias enfermedades como diversos tipos de cáncer (Adam *et al.*, 2006; Losa, 2012). Igualmente, se ha propuesto que los fractales pueden explicar la diversidad de especies y la complejidad de los ecosistemas (Brown *et al.*, 2002). También ha sido aplicada a las filogenias (son un fractal) y la teoría evolutiva, lo cual puede permitir una mejor categorización de las taxones en una clasificación más natural, así como para entender el proceso evolutivo (Green, 1991). Inclusive se ha propuesto el uso de la dimensión fractal para la identificación de especies de plantas (Martinez *et al.*, 2008), así como para establecer relación entre la dimensión fractal de la vegetación con la distribución de artrópodos basado en la longitud su cuerpo (Morse *et al.*, 1985).

2.4.1.1. Análisis fractales aplicados al músculo esquelético

Uno de los primeros trabajos en aplicar los métodos fractales en musculo esqueléticos fue el realizado por Arsos y Dimitriu (1995), donde ellos observan que las fibras tipo II presentan una organización fractal en el m. *EDL* de ratas jóvenes y adultas.

Sin embargo, la mayoría de los trabajos se han centrado más en el tejido vascular en el músculo esquelético, como lo es el flujo sanguíneo (Iversen y Nicolaysen, 1995; Kalliokoski *et al.*, 2003) y la perfusión de oxígeno a las fibras (Kalliokoski *et al.*, 2001) presentan un comportamiento fractal. Asimismo, se ha planteado el uso de métodos fractales para hacer una evaluación cuantitativa y no sólo cualitativa de los cambios morfológicos debido lesiones (Ozaki *et al.*, 2015).

2.5. Funciones de distribución

Las funciones de distribución se crean a partir de hacer superposiciones lineales de funciones de base radial Gaussianas, las cuales debido a sus propiedades, permiten ajustar o reconstruir señales o funciones, comparar datos, determinar la estabilidad de puntos de equilibrio y establecer que tan distintas son dos funciones de distribución (García *et al.*, 2015).

2.5.1. Método de funciones de base radial

Los métodos de funciones de base radial (BRF por sus siglas en inglés) son el medio para aproximar funciones multivariadas, principalmente cuando dependen de muchas variables o parámetros, están definidas por, posiblemente, muy pocos datos y los datos se encuentran dispersos en su dominio (Buhmann, 2004). Las BRF son una clase especial de función, cuya característica distintiva es que su respuesta incrementa o disminuye monótonamente con la distancia desde un punto central. El centro, la escala de distancia y la forma precisa de la forma de una función radial son parámetros del modelo (Orr, 1996).

Una BRF típica generalmente tiene la forma de $\phi(r) = \phi(\varepsilon \|\underline{x} - \underline{x}_j\|)$, donde ε es el parámetro de forma de la función de base radial. Las funciones radiales más populares son: Gaussianas ($\phi(r) = e^{-(\varepsilon r)^2}$), multicuadráticas ($\phi(r) = \sqrt{1 + (\varepsilon r)^2}$), multicuadráticas inversas ($\phi(r) = \frac{1}{\sqrt{1 + (\varepsilon r)^2}}$), cuadráticas inversas ($\phi(r) = \frac{1}{1 + (\varepsilon r)^2}$) y Spline poliarmónico ($\phi(r) = r^k, k = 1, 3, 5 \dots; r^k \ln(r), k = 2, 4, 6 \dots$) (Wang, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que la desnutrición afecta diversos tejidos, entre ellos la musculatura estriada, uno de los tejidos metabólicamente más activos e indispensables para el control motriz (Zhu *et al.*, 2006). Trabajos realizados sobre el efecto de la desnutrición en el cambio fenotípico de los tipos de fibra (Parada-Simão *et al.*, 2011; Ruíz-Rosado *et al.*, 2013; Pereyra-Venegas *et al.*, 2015), especialmente en el músculo *extensor digitorum longus* (m. *EDL*), han mostrado que se presentan las mayores alteraciones en el desarrollo y la maduración de las fibras musculares entre los 35 y 45 días de edad postnatal. Hasta ahora, los trabajos realizados utilizan al m. *EDL* completo para su análisis (Toscano *et al.*, 2008; Ruíz-Rosado *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2014; Pereyra-Venegas *et al.*, 2015). Sin embargo, este músculo se divide en cuatro fascículos (Balice-Gordon y Thompson, 1988) con función y tamaño diferente, por lo que un corte sesgado hacia algún extremo del músculo eliminaría información relevante sobre la composición total del músculo e individual de los fascículos. Asimismo, existe una discrepancia entre los efectos de la desnutrición crónica entre Ruíz-Rosado *et al.* (2013) y Pereyra-Venegas *et al.* (2015), pues en el primero se encuentra un aumento de fibras intermedias (IIa) y en el segundo se da un aumento de fibras rápidas (IIb). Por todas estas razones y con el fin de conocer si dicha discrepancia en resultados es debida a que la desnutrición crónica afecta de manera particular a los fascículos del m. *EDL* en este trabajo analizamos los cuatro fascículos de m. *EDL* en ratas de macho *Wistar* de 35 días de edad los cambios en los fenotipos de las fibras en cada uno de ellos. Asimismo, se analizó si las fibras musculares de los fascículos del m. *EDL* presentan organización no aleatoria (fractal), pues Arsos y Dimitriu (1995) hallaron que esto ocurre, pero en el músculo completo y con una muestra muy pequeña de fibras; y aunado a esto se determinaron los patrones de distribución de los tipos de fibras, para posteriormente comparar y ver si la desnutrición crónica afecta estas características.

4. HIPÓTESIS

En los fascículos del m. *EDL* de la rata macho *Wistar* de 35 días,

- a. La falta de nutrientes debida a la desnutrición crónica afectará los porcentajes de fibras lentas, intermedias y rápidas, dándose una transición de fibras rápidas a un fenotipo de fibras intermedias y de intermedias a lentas, así como el respectivo cambio de metabolismo glucolítico a metabolismo oxidativo.
- b. Como consecuencia de los cambios en los porcentajes de los tipos de fibras en los fascículos del m. *EDL* se presentarán modificaciones en la organización fractal y los patrones de distribución de las fibras.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la desnutrición crónica sobre la composición, distribución y organización de las fibras en los fascículos del músculo *extensor digitorum longus* de ratas macho *Wistar* de 35 días de edad mediante técnicas histoenzimáticas y métodos matemáticos.

5.2. Objetivos particulares

En los fascículos del músculo *extensor digitorum longus* de ratas de 35 días de edad,

- Determinar el efecto de la desnutrición sobre el porcentaje de fibras lentas, intermedias y rápidas presentes utilizando la técnica histoenzimática de ATPasa alcalina (pH 9.4)
- Determinar el efecto de la desnutrición sobre el porcentaje de fibras oxidativas y glucolíticas utilizando la técnica histoenzimática de NADH-TR.
- Evaluar la organización fractal de las fibras clasificadas por las técnicas histoenzimáticas de ATPasa alcalina y NADH-TR para las ratas control y desnutridas utilizando el método de correlación integral fractal.
- Analizar los patrones de distribución de las fibras clasificadas por las técnicas histoenzimáticas de ATPasa alcalina y NADH-TR para las ratas control y desnutridas mediante el método de funciones de distribución.

6. METODOLOGÍA

En resumen, la metodología aplicada en este trabajo se muestra en la Fig. 10.

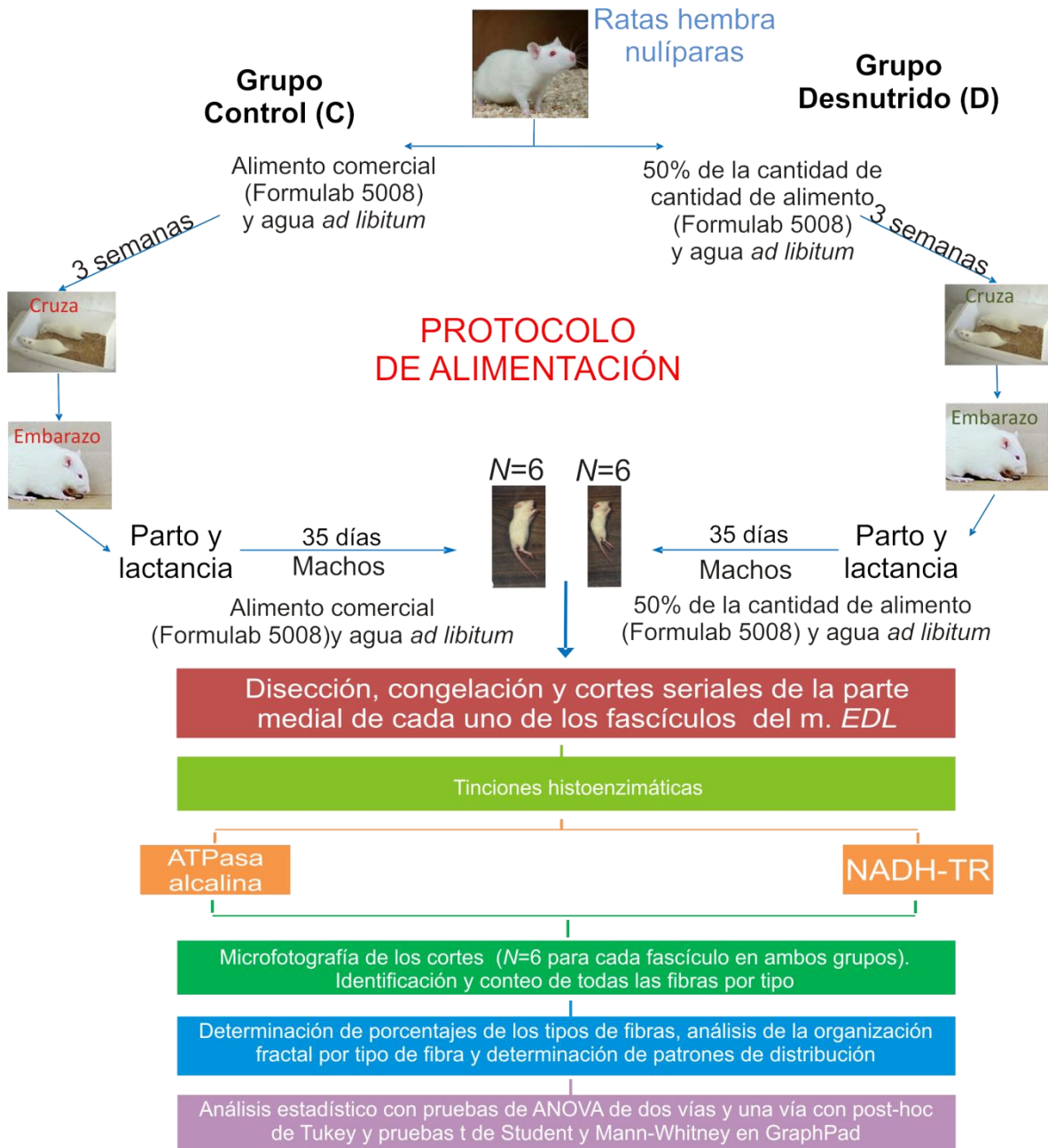


Figura 10. Protocolo de desnutrición crónica aplicado a ratas macho *Wistar* de 35 días de edad, así como análisis hechos a los tipos de fibras de los fascículos del m. *EDL*.

6.1. Animales

Se utilizaron ratas *Wistar* (*Rattus norvegicus*) hembras nulíparas de 5 a 6 meses de edad, las cuales se dividieron en dos grupos, uno control (C) y uno desnutrido (D). El grupo control tuvo libre acceso a comida comercial (durante todo el periodo experimental); mientras que el grupo desnutrido recibió el 50% de la comida suministrada al grupo control. A las 3 semanas de dar el tratamiento, las hembras se cruzaron con ratas machos durante una semana para quedar gestantes. Las camadas resultantes fueron ajustadas a 9 críos (5 machos y 4 hembras). El protocolo de alimentación se mantuvo durante toda la gestación, parto y lactancia, después del destete, los críos siguieron el mismo protocolo alimenticio que sus madres (C y D), teniendo ambos grupos acceso ilimitado al agua y fueron alojados bajo las mismas condiciones ambientales del ciclo luz/oscuridad (12:12 h) y temperatura (22-24 °C). Para las observaciones experimentales se utilizaron machos (n=6, seleccionados al azar de las distintas camadas) para cada grupo. Al cumplir 35 días de edad, los individuos se pesaron, posteriormente se anestesiaron para hacer la disección de los cuatro fascículos (F2, F3, F4 y F5) del músculo *extensor digitorum longus* (m. *EDL*), obteniéndose un total de 24 fascículos (6 de cada uno) por grupo. Posteriormente fueron eutanizados mediante una sobredosis de anestesia (uretano).

6.2. Disección y preparación del tejido para el análisis histoenzimático

Los fascículos del músculo *EDL* de las extremidades posteriores derecha e izquierda se removieron rápidamente, pesaron (el músculo completo) y se midió la longitud de cada uno de los fascículos; finalmente, se colocaron en isopentano (crioprotector) para ser congelados con nitrógeno líquido. La sección medial de cada fascículo fue montada sobre una platina portamuestras en una solución de Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura® Finetek, Torrance, California), de cada uno fascículo de ambos grupos se obtuvieron por duplicado series de cortes transversales de 10 µm de grosor en un criostato a -25 °C (CM-1520; Leica Biosystems, Nussloch, Alemania). Los cortes se montaron en un portaobjetos y se almacenaron a -80 °C hasta ser procesados para su tinción histoquímica respectiva.

6.2.1. Histoquímica para ATPasa pH 9.4

En secciones seriales subsecuentes de tejido, la actividad miofibrilar de la ATPasa a pH 9.4 se visualizó usando la técnica de la ATPasa alcalina (pH 9.4) (Modificado de Guth y Samaha, 1970). Las secciones de los fascículos se sumergieron en una solución de

preincubación de 0.01 M de Tris base y CaCl_2 al 2% (pH 9.4) por 20 minutos. Las muestras se lavaron tres veces por 5 minutos con agua desionizada y posteriormente se incubaron a 37 °C por 1 hora en 0.15% (p/v) de adenosin-5'-trifosfato en un solución de preincubación a pH 9.4. Después la muestras se incubaron en 2% de CaCl_2 por 35 minutos, se transfirieron una solución 2% p/v de CoCl por otros 35 minutos, se lavaron 10 veces con agua destilada y se transfirieron a una solución 10% v/v de $(\text{NH}_4)_2\text{HSO}_4$ por 3 minutos para revelarlas. Posteriormente las secciones se lavaron, deshidrataron y se cubrieron con glicerogel (2% gelatina, 50% glicerol y 0.5% fenol) y cubreobjetos para su posterior análisis.

6.2.2. Histoquímica para NADH-TR

El tipo de metabolismo (oxidativo o glucolítico) de las fibras musculares fue determinado mediante el método histoquímico de NADH-TR, modificado de Nachlas *et al.* (1958). Las secciones de músculo se incubaron 1 hora a 37 °C en un solución 1:1 (v/v) de NBT-NADH [1.2 mM nitroazul de tetrazolio diluido en 50 mM de buffer Tris (pH 7.6), 2.25 mM de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) diluido en 50 mM de buffer Tris (pH 7.6)]. Posteriormente, las secciones de tejido se lavaron tres veces con agua desionizada. El exceso de la solución NBT-NADH se removió lavando las secciones con concentraciones crecientes (30, 60 y 90 %) y decrecientes (90, 60, 30 %) de acetona. Finalmente, las preparaciones se cubrieron con glicerogel (2% gelatina, 50% glicerol y 0.5% fenol) y cubreobjetos para su posterior análisis.

6.3. Análisis de imágenes

De cada sección de fascículo se eligió un corte para tomarle microfotografías mediante cámara digital montada en un microscopio de luz con un objetivo de 10X, puesto que de cada uno se obtenían más de una imagen se unieron con el uso del programa Adobe Photoshop (versión 2014.2.2, Adobe Systems Incorporated, California, E. U. A.). Utilizando la técnica de la ATPasa alcalina (pH 9.4), con base a la intensidad de la tinción, las fibras claras, grises y oscuras se identificaron como lentas (I), rápidas (IIb) e intermedias (IIa), respectivamente (Fig. 11).

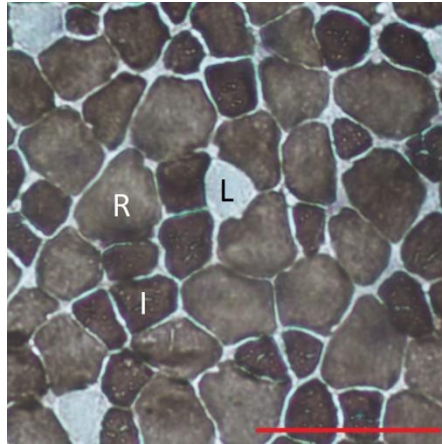


Figura 11. Microfotografía del F5 teñido con la técnica histoenzimática de ATPasa alcalina (pH 9.4). Fibras lentas (L), de color blanco o incoloras, intermedias (I), de color negro o gris oscuro y rápidas (R), de color gris. Barra de escala, 100 μ m.

Las fibras en las secciones de fascículos teñidas por la técnica de NADH-TR se clasificaron de acuerdo al siguiente criterio: las fibras oscuras se identificaron como oxidativas; mientras que las claras se consideraron como glucolíticas (Fig. 12).

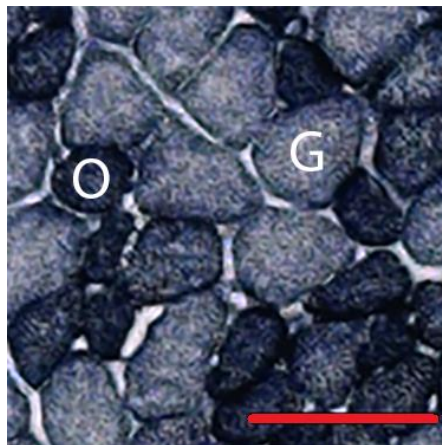


Figura 12. Microfotografía del F5 teñido con la técnica histoenzimática de NADH-TR. Fibras con metabolismo oxidativo (O), color azul oscuro y metabolismo glucolítico (G), color azul claro. Barra de escala, 100 μ m.

El conteo de los distintos tipos de fibras se realizó con el programa ImageJ (versión 1.48, Rasband, W., National Institutes of Health, E. U. A.) con el cual se colocó un punto en el centro (centroide) de cada una de las fibras identificadas como lentas, intermedias o rápidas, así como oxidativas o glucolíticas de los cortes de los fascículos y

se determinaron sus coordenadas cartesianas. Los valores X, Y de los puntos se almacenaron en archivos Excel para su posterior análisis. Con base al conteo de fibras se determinó el número total de las fibras de cada tipo y se calculó el porcentaje de éstas por muestra y posteriormente para cada uno de los fascículos de ambos grupos (C y D), con las dos técnicas histoenzimáticas. Asimismo, con ImageJ se midieron las áreas de cada uno de los fascículos.

6.3.1. Determinación de metabolismo de fibras intermedias

Puesto que las fibras intermedias poseen un metabolismo mixto (i.e. glucolítico y oxidativo), se procedió a determinar cuál de los dos metabolismos es predominante en esta clase de fibras. Para esto se siguió el siguiente procedimiento: a) Se obtuvo la diferencia entre el porcentaje de fibras oxidativas obtenidos con la técnica de la NADH-TR y el de las lentas determinadas con la técnica de ATPasa alcalina. El valor obtenido se consideró como el porcentaje de fibras intermedias con predominancia de metabolismo oxidativo; b) De manera similar se obtiene el porcentaje de fibras intermedias con predominancia de metabolismo glucolítico al calcular la diferencia entre el porcentaje de fibras glucolíticas y el porcentaje de fibras rápidas.

6.4. Caracterización de las modificaciones del fenotipo de las fibras en los fascículos del músculo *EDL*

Para establecer el sentido y la magnitud en que se modifica el fenotipo metabólico y la expresión de la ATPasa de la miosina de los tipos de fibras, por efecto de la desnutrición crónica, se siguió el siguiente razonamiento: 1) Determinar la diferencia de los porcentajes de tipos de fibras (lentas, intermedias oxidativas, intermedias glucolíticas y rápidas) entre el grupo control y el grupo desnutrido; 2) Localizar el valor máximo absoluto de las diferencias; 3) Cada valor de las diferencias se dividió entre el valor máximo absoluto para establecer una relación proporcional de todos los fascículos, quedando un rango de intensidad de cambio de 0 a 1, donde 0 implica que no hubo cambio de fenotipo en el tipo de fibra; mientras que 1 significa que todas las fibras de un tipo se cambió a un fenotipo distinto. Las diferencias en los porcentajes de las fibras entre los grupos control y desnutrido podían ser positivas o negativas, por lo que se consideró que las negativas implicaban una pérdida en el porcentaje de un tipo de fibras; mientras que las positivas representaban un aumento en su porcentaje; por lo que, de aquel fenotipo con diferencia negativa, salía una flecha con dirección hacia el fenotipo con diferencia positiva o menor

diferencia negativa, siguiendo la regla del vecino más cercano (i.e. lentas ↔ intermedias oxidativas ↔ intermedias glucolíticas ↔ rápidas).

6.5. Análisis de la organización fractal

Para este análisis se utilizó el método de correlación integral fractal, utilizando el programa Fractalyse 2.4 (disponible en: <http://www.fractalyse.org/>). Para poder utilizar el programa se utilizaron los grupos de coordenadas X, Y para cada tipo de fibra y se generaron imágenes binarias (Fig. 13) (ver Apéndice 1), las cuales fueron ingresadas en el programa.

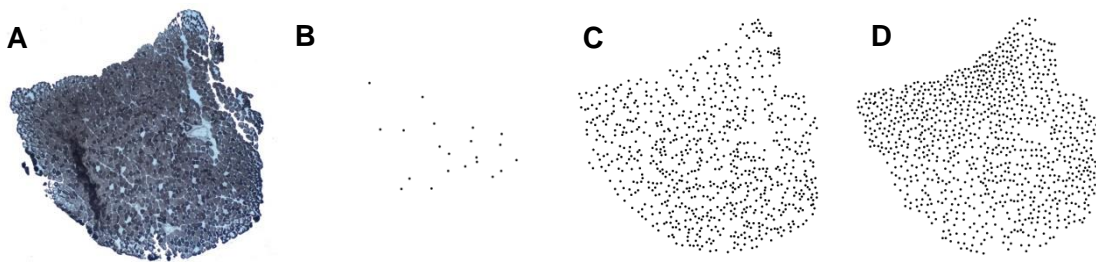


Figura 13. Fotomicrografía del F5 (A) teñido con la técnica de ATPasa alcalina (pH 9.4) con sus respectivas imágenes binarias de las fibras lentas (B), intermedias (C) y rápidas (D).

El método de correlación integral fractal consiste en medir las distancias entre fibras ($R_{i,k}$) de todas las posibles combinaciones (N_c), esto para cada tipo de fibra; posteriormente se divide el número de fibras con la misma distancia (N_r) entre el número de posibles combinaciones (N_c), para obtener la correlación, es decir, que tanto se ajustan los datos observados a los datos esperados:

$$C(r) = \frac{N_r}{N_c}$$

Para la estimación de la dimensión fractal, se utilizan ventanas cuadradas de tamaño ϵ , se cuenta el número de fibras dentro de estas ventanas y se estima la media para las ventanas de ese tamaño, esto se va repitiendo cada vez con ventanas de mayor tamaño, después las medias de cada tamaño de ventana se gráfica, donde el eje X representa el tamaño de la ventana (ϵ) y el eje Y representa la media de fibras por ventana. El siguiente paso es ajustar la curva obtenida con los datos a una curva teórica que corresponde a una ley de potencia que une el número de correlaciones con el tamaño de la ventana:

$$(N = \varepsilon^D)$$

Sin embargo, debido a que los datos reales no siguen estrictamente la ley fractal, es útil introducir una ley fractal generalizada, que contiene dos parámetros adicionales:

$$y = a\varepsilon^D + c$$

Donde a es el “prefactor de forma” (un valor de 1, indica que se trata de un fractal, pero valores >0.1 y <4.0 dicen que es muy probable que sea un fractal). El exponente D , hace referencia a la dimensión fractal que presenta el tipo de fibra analizado ($D=0$ indica que es un punto, $D<1$ existen elementos no conectados entre sí, $D>1$ hay elementos formando grupos, los cuales están interconectados, D cercano a 2, los elementos está interconectados y forman un gran grupo, $D=2$ los elementos se distribuyen uniformemente, formando una sola escala). Y el parámetro c corresponde al punto de origen en el eje y .

6.6. Análisis de la distribución de las fibras

Se utilizó el método de funciones de base radial (RBF, por sus siglas en inglés) de Viveros-Rogel *et al.* (en proceso), programado en MatLab v. 7.10.0.499 (The MathWorks, Natick, Massachusetts, E. U. A.) por Chávez-Fragoso *et al.* (2015). Para utilizarlo se requiere el nombre de los archivos de Excel para cada tipo de fibra de una muestra (dichos archivos contenían las coordenadas X , Y de los centroides de las fibras y el tamaño de la fotografía en pixeles), asimismo, se ingresa el valor del número de celdas, resolución y objetivo con que fue tomada la fotografía, quedando como en el siguiente ejemplo:

```
h=CombinarFuncionesATP('Ráp_F5, I, C.xlsx','Int_F5, I, C.xlsx','Len_F5, I,
C.xlsx',11,200,'10x')
```

El método, de manera general, consiste en utilizar las coordenadas de los centroides para cada tipo de fibra, éstos se delimitan dentro de un marco, el cual se divide en $N \times N$ celdas [el valor N óptimo se consideró como aquél cuyo histograma mostró dos o tres colores altos (rojo, naranja), tres colores intermedios (amarillo, verde) y tres colores bajos (azules)] (Fig. 14). A continuación, se hace un conteo de los puntos dentro de cada celda y se construye una función gaussiana para cada una de las celdas; y superponiendo linealmente las funciones de densidad de cada celda se obtiene la función de distribución

espacial de cada tipo de fibra. Finalmente, se combinan las funciones de distribución de los tipos de fibra para cada muestra de las distintas tinciones, quedando en cada celda sólo el color del tipo de fibra dominante y la altura de cada pico es dada por la cantidad de fibras, excepto en aquéllos para técnica de ATPasa pH 9.4, donde la altura está dada por la fuerza promedio en cada celda, esto al multiplicar el número de fibras por 1, 8 o 40, de acuerdo a si son fibras lentas, intermedias o rápidas, respectivamente.

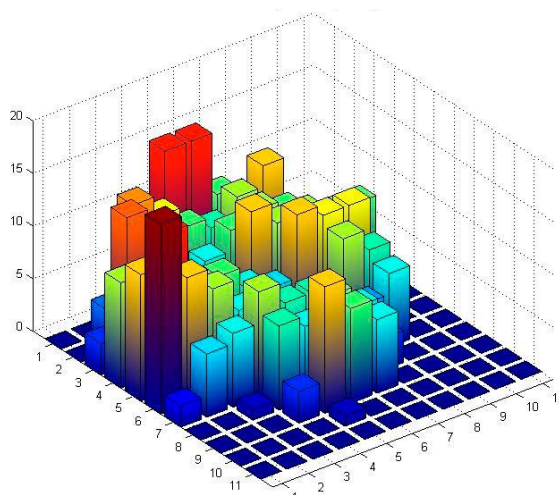


Figura 14. Ejemplo de un valor N óptimo ($N=11$) para una imagen histológica.

Método completo, así como el *script* en los Apéndices 2 y 3, respectivamente.

6.7. Análisis estadístico

Inicialmente, se procedió a revisar la distribución de los datos mediante la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov. Mediante la prueba de ANOVA de dos vías, seguidas por *post-hoc* de Tukey, se compararon los porcentajes de los distintos tipos de fibras (lentas, intermedias y rápidas o glucolíticas y oxidativas) y la dimensión fractal entre fascículos (F2, F3, F4 y F5) y entre grupos (control y desnutrido). Mediante una ANOVA de una vía, seguida por la prueba *post-hoc* de Tukey o Kruskal-Wallis *post-hoc* de Tukey para datos con distribución no normal, se compararon los parámetros a y C entre los tipos de fibras y grupos; asimismo, se realizaron comparaciones entre el grupo control y el grupo desnutrido de los parámetros morfométricos con pruebas t de Student de dos colas con corrección de Welch para datos paramétricos y Mann-Whitney para datos no paramétricos. Todas las pruebas se realizaron en GraphPad Prisma (versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, California, E. U. A.). Se consideraron diferencias significativas cuando la probabilidad fuese $P \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Parámetros morfométricos

Los animales del grupo desnutrido presentaron una disminución del 68.64% de peso corporal, con respecto a los individuos del grupo control (C 116.10 ± 11.46 g vs. D 36.40 ± 3.65 g; $t_{14}=6.63$; $P<0.0001$). Lo mismo ocurre con respecto al peso del músculo *EDL*, donde se ve una reducción del 78.33% en el grupo desnutrido, comparado con el grupo control (C 60 ± 8 mg vs. D 13 ± 2.2 mg; $t_{10}=16.22$; $P<0.0001$).

En general, los cuatro fascículos tuvieron una menor longitud en el grupo desnutrido que en el grupo control ($F_{15,80}=66.12$; $P<0.0001$), pero ésta no fue igual para cada fascículo, pues el F2 tuvo un reducción de cerca del 40%; mientras que los F4 y F5 fueron los menos afectados, con un reducción menor a 20% (Tabla 3).

Tabla 3. Peso del m. *EDL* y longitud de los fascículos (F2, F3, F4 y F5) en los grupos control (C) y desnutrido (D) en ratas macho *Wistar* de 35 días de edad.

m. <i>EDL</i>		Fascículos							
		Longitud (mm)							
Peso (mg)		F2		F3		F4		F5	
		Izq.	Der.	Izq.	Der.	Izq.	Der.	Izq.	Der.
C	60.0 ± 8.0	19.7 ± 0.28	19.3 ± 0.3	19.5 ± 0.4	19.6 ± 0.6	21.6 ± 0.2	21.4 ± 0.3	22.5 ± 0.4	22.4 ± 0.4
D	13.0 ± 2.2	12.2 ± 0.39	12.4 ± 0.3	14.6 ± 0.5	15.2 ± 0.4	17.3 ± 0.3	17.5 ± 0.3	18.2 ± 0.3	18.2 ± 0.2
	****	****	****	****	****	****	****	****	****

t de Student para peso ($t_{10}=16.22$); ANOVA de dos vías, seguido de una *post-hoc* de Tukey ($F_{15,80}=66.12$). Diferencias significativas: * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$. $N=6$.

Los fascículos del m. *EDL* del grupo control fueron de mayor tamaño respecto a los del grupo desnutrido, observándose mayor reducción en el F2 y F5 con un 50% con respecto a los controles (F2 C 0.99 ± 0.12 mm² vs. D 0.49 ± 0.03 mm²; $U_{6,6}=0$ $P<0.01$; F5 C 2.15 ± 0.25 mm² vs. D 1.08 ± 0.11 mm²; $t_{6,97}=3.94$; $P<0.01$); mientras que los F3 y F4 sólo tuvieron una reducción menor de 40% (F3 C 0.75 ± 0.08 mm² vs. D 0.47 ± 0.05 mm²; $t_{8,73}=2.95$; $P<0.05$; F4 C 0.70 ± 0.07 mm² vs. D 0.48 ± 0.05 mm²; $t_{9,06}=2.51$; $P<0.05$) (Fig. 15).

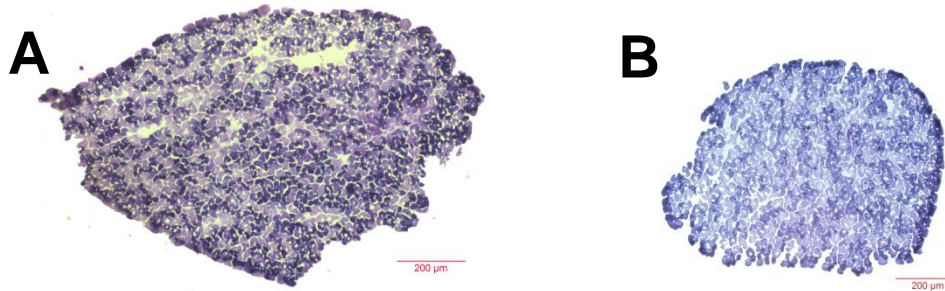


Figura 15. Microfotografías del F2 del grupo control (A) y desnutrido (B), teñidos con la técnica histoenzimática de NADH-TR. Barra de escala, 200 µm.

El conteo de las fibras para cada fascículo muestra un número significativamente mayor en el grupo control respecto al desnutrido en los F2, F3 y F4 ($P < 0.05$ a $P < 0.001$); excepto en el F5, donde se muestra un número inferior, pero es significativo (Tabla 4).

Tabla 4. Número de fibras totales en los fascículos (F2, F3, F4 y F5) del m. *EDL* en los grupos control (C) y desnutrido (D) de ratas macho *Wistar* de 35 días de edad.

	Número total de fibras	
	C	D
F2	1508 ± 141.9	631.8 ± 50.84***
F3	1295 ± 148.9	845.7 ± 94.75*
F4	1240 ± 178.1	650.8 ± 89.07*
F5	1676 ± 114.2	1209 ± 203.5

t de Student. Diferencias significativa: * $P < 0.05$ ($t_{10}=1.81$); ** $P < 0.01$ ($t_{10}=2.76$); *** $P < 0.001$ ($t_{10}=4.14$). $N=6$.

7.2. Histoquímicas

7.2.1. Histoquímica para ATPasa alcalina (pH 9.4)

La comparación por fascículo dentro de los grupos mostró que en el F2 del grupo control, el porcentaje de fibras intermedias ($59.66 \pm 4.54\%$) es significativamente mayor respecto al porcentaje de fibras lentas ($8.62 \pm 1.58\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P < 0.001$) y rápidas ($31.72 \pm 5.42\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P < 0.001$). Asimismo, el porcentaje de rápidas es mayor respecto a las fibras lentas (R, $31.72 \pm 5.42\%$ vs. L, $8.62 \pm 1.58\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P < 0.001$). El F2 del grupo desnutrido mostró la misma tendencia en cuanto al porcentaje para cada fenotipo de fibra (I, $57.66 \pm 5.21\%$ vs. L, $4.45 \pm 0.65\%$ y R, $37.88 \pm 5.39\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P < 0.001$; R, $37.88 \pm 5.39\%$ vs. L, $4.45 \pm 0.65\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P < 0.001$) al del grupo control (Fig. 16 A). En el F3 el porcentaje de fibras rápidas es significativamente mayor respecto al porcentaje de fibras lentas en ambos grupos (C y D) (RC, $46.03 \pm 5.53\%$ vs. LC, $2.08 \pm 0.28\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P < 0.001$; RD, $29.68 \pm 4.07\%$ vs. LD, $3.08 \pm 0.59\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P < 0.001$).

Por una parte, en el grupo control, el porcentaje de fibras intermedias ($51.89 \pm 5.45\%$) es mayor sólo al porcentaje de fibras lentas ($2.08 \pm 0.28\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P<0.001$) y por otra, en el grupo desnutrido, el porcentaje de fibras intermedias ($67.24 \pm 4.08\%$) es mayor respecto al de fibras lentas ($3.08 \pm 0.59\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P<0.001$) y rápidas ($29.68 \pm 4.07\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P<0.001$) (Fig. 16 B). El F4 presenta una composición similar al F2, tanto del grupo control, como del desnutrido; excepto que en el F4 desnutrido no se encontró diferencia significativa entre el porcentaje de fibras intermedias ($53.63 \pm 3.66\%$) y rápidas ($42.25 \pm 4.00\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P>0.05$) (Fig. 16 C). En el F5, a diferencia de los F2, F3 y F4, se encontró un mayor porcentaje de fibras rápidas ($53.67 \pm 2.03\%$) que intermedias ($45.25 \pm 2.06\%$; $P<0.001$) y lentas ($1.08 \pm 0.18\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P<0.001$) en el grupo control; mientras que en grupo desnutrido, el porcentaje de fibras lentas ($0.71 \pm 0.09\%$) es significativamente menor respecto al de las fibras intermedias ($54.41 \pm 1.10\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P<0.001$) y rápidas ($44.88 \pm 1.08\%$; $F_{15,117}=5.403$; $P<0.001$) (Fig. 16 D).

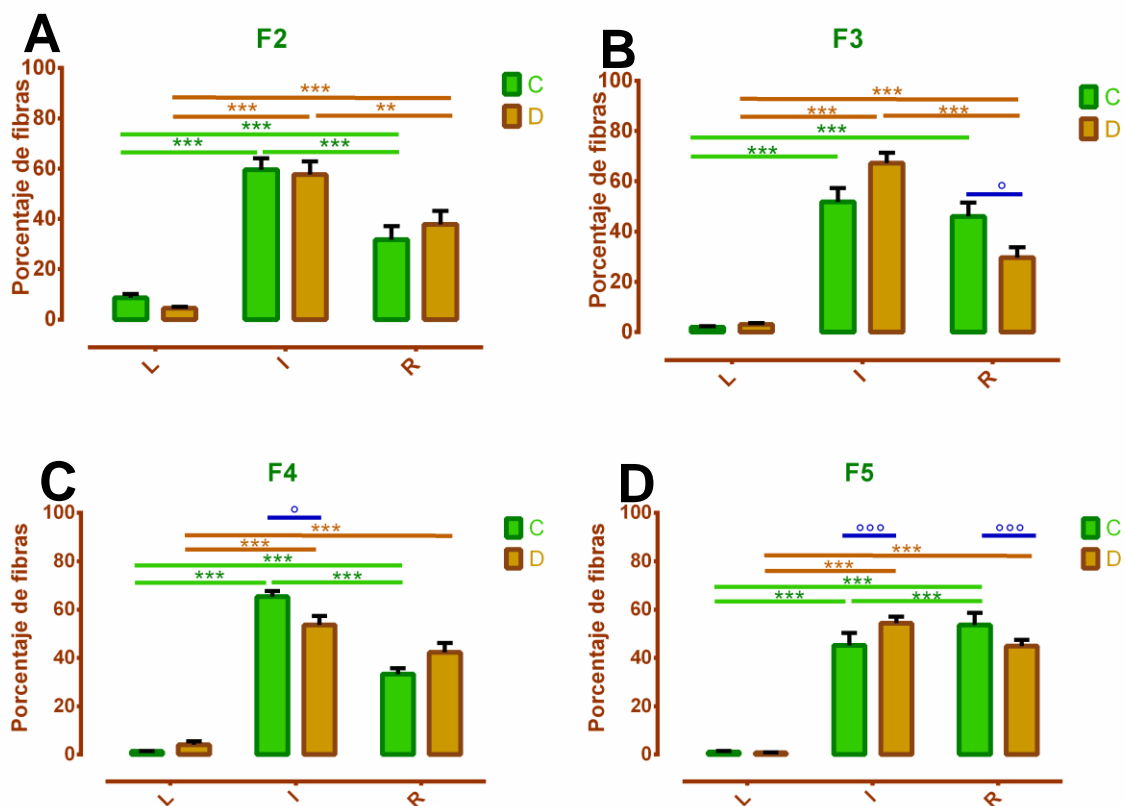


Figura 16. Porcentaje de fibras lentas (L), intermedias (I) y rápidas (R) en cada fascículo (A, F2; B, F3; C, F4; y D, F5) del m. EDL en los grupos control (C) y desnutrido (D) de ratas macho de 35 días de edad. Los datos muestran la media \pm SEM. Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey ($F_{15,117}=5.403$). Diferencias significativas entre fibras del mismo fascículo y grupo * $P < 0.05$; **

P<0.01; *** P<0.001; diferencias significativas entre grupos ° P<0.05; °° P<0.01; °°° P<0.001. N=6, excepto en F4 (D), donde N=5.

La comparación por fenotipo de fibra entre los grupos control y desnutrido (C y D) mostró diferencias significativas en el porcentaje de fibras rápidas, siendo mayor en el grupo control tanto en el F3 (C, 46.03±5.53% vs. D, 29.68±4.07%; $F_{15,117}=5.403$; P<0.05), como en el F5 (C, 53.67±2.03% vs. D, 44.88±1.08%; $F_{15,117}=5.403$; P<0.001). Asimismo, el porcentaje de fibras intermedias en el F4 fue significativamente menor en el grupo desnutrido (C, 65.33±2.38% vs. D, 53.63±3.66%; $F_{15,117}=5.403$; P<0.05); mientras que en el F5 el porcentaje de fibras intermedias fue menor en el grupo control (C, 45.25±2.06% vs. D, 54.41±1.10%; $F_{15,117}=5.403$; P<0.001) (Fig. 16).

Ver Apéndices 4 y 5 para consultar los valores de cada tipo de fibra en los fascículos de ambos grupos, así como las diferencias significativas de las todas comparaciones.

7.2.2. Histoquímica para NADH-TR

El análisis con la tinción con NADH-TR mostró que en el F2 de los músculos *EDL* del grupo control, el porcentaje de fibras oxidativas (55.28±0.88%) fue significativamente mayor el de las fibras glucolíticas (44.72±0.88%; $F_{9,80}=21.92$; P<0.01); mientras que en el grupo de los animales desnutridos no se observaron diferencias entre los porcentajes de fibras oxidativas y glucolíticas (Fig. 17 A). En el F3 no se encontraron diferencias entre los porcentajes de fibras tanto en el grupo control, como en el grupo desnutrido (Fig. 17 B). En el F4 se encontró un mayor porcentaje de fibras glucolíticas (59.50±2.46%) que oxidativas (40.50±2.46%; $F_{9,80}=21.92$; P<0.001) en el grupo desnutrido, pero no así en el grupo control (Fig. 17 C). En cambio en el F5 se presentó un mayor porcentaje de fibras glucolíticas (GC 57.06±2.04%; GD 63.27±2.44%) respecto a las fibras oxidativas (OC 42.94±2.04%; $F_{9,80}=21.92$; P<0.001; OD 36.73±2.44%; $F_{9,80}=21.92$; P<0.001) tanto en el grupo control, como en el desnutrido (Fig. 17 D).

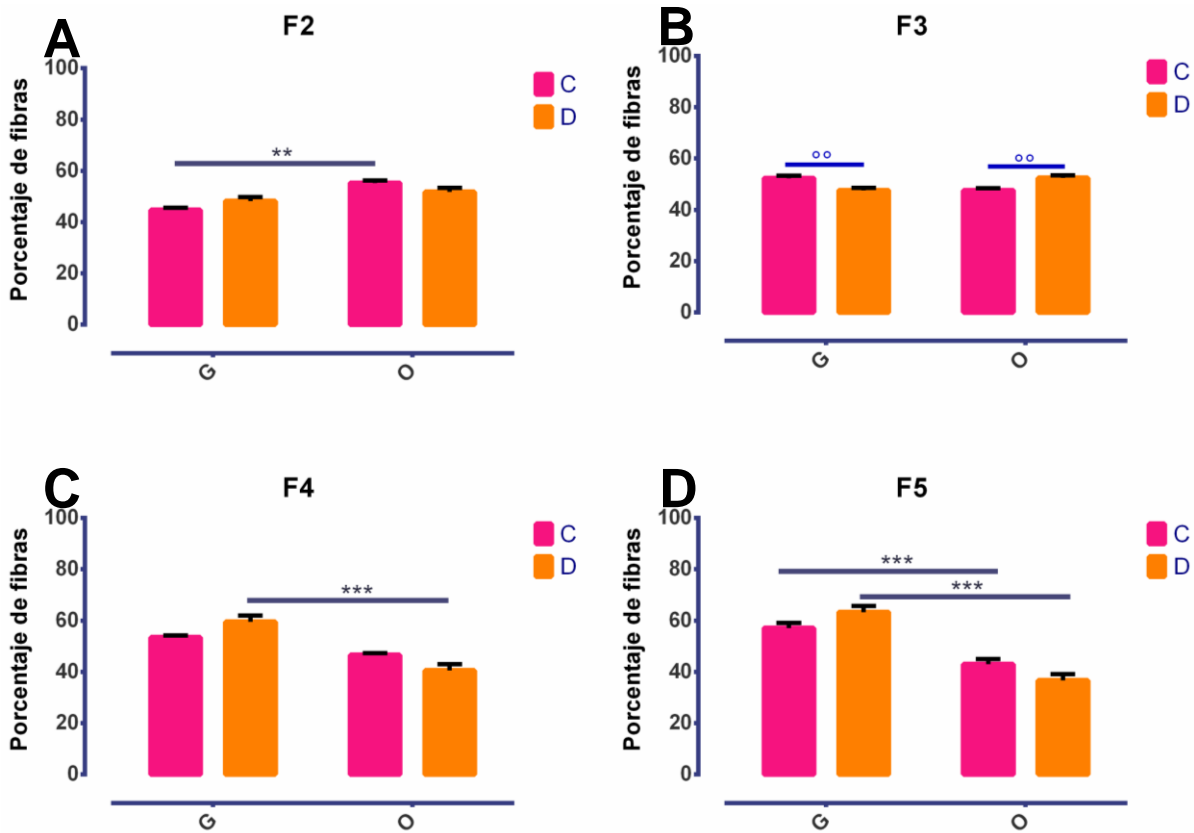


Figura 17. Porcentaje de fibras oxidativas (O) y glucolíticas (G) en cada fascículo (A, F2; B, F3; C, F4; y D, F5) del m. *EDL* en los grupos control (C) y desnutrido (D) de ratas macho de 35 días de edad. Los datos muestran la media \pm SEM. Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey ($F_{9,80}=21.92$). Diferencias significativas entre fibras del mismo fascículo y grupo * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; diferencias significativas entre grupos ° $P < 0.05$; °° $P < 0.01$. $N=6$.

Con respecto al tipo de metabolismo de las fibras de los distintos fascículos de los músculos *EDL* de los animales control y desnutridos se observó que únicamente el F3 del grupo control presenta diferencias en los porcentajes de fibras glucolíticas y oxidativas entre el grupo control y desnutrido. En este fascículo se presenta un mayor porcentaje de fibras glucolíticas en el grupo control que en el de los desnutridos (C $52.38 \pm 0.88\%$ vs. D $47.60 \pm 1.01\%$; $F_{9,80}=21.92$; $P < 0.01$) y en concordancia, se tiene un mayor porcentaje de fibras oxidativas en los desnutridos que en los controles (C $47.62 \pm 0.88\%$ vs. D $52.40 \pm 1.01\%$; $F_{9,80}=21.92$; $P < 0.01$) (Fig. 17).

Ver Apéndices 7 y 8 para consultar los valores de cada tipo de fibra en los fascículos de ambos grupos, así como las diferencias significativas de las todas comparaciones.

7.3. Proporción de fibras del tipo intermedio que poseen metabolismo oxidativo o glucolítico en los fascículos de músculos *EDL* en animales control o desnutrido

Los porcentajes de fibras intermedias que poseen metabolismo predominantemente oxidativo o glucolítico en los fascículos del músculo *EDL* de animales control (C) y desnutrido (D), junto con los porcentajes de fibras lentas y rápidas se muestran en la gráfica de la Figura 18. Como se puede apreciar en esa Figura 18, en el F2 no se observan diferencias significativas entre los porcentajes de las fibras lentas, rápidas e intermedias (ya sea con metabolismo oxidativo o glucolítico) de los fascículos control y desnutridos. En cambio, en los F3 y F5 de los músculos desnutridos presentan un notorio incremento en la proporción de fibras intermedias con metabolismo glucolítico (F3 C $6.35 \pm 5.34\%$ vs. D $17.92 \pm 4.15\%$; $F_{21,156}=4.029$; $P>0.05$; F5 C $3.39 \pm 2.25\%$ vs. D $18.39 \pm 2.24\%$; $F_{21,156}=4.029$; $P<0.0001$), el cual se ve acompañado de un decremento proporcional en el porcentaje de fibras del tipo rápido (F3 C $46.03 \pm 5.53\%$ vs. D $29.68 \pm 4.07\%$; $F_{21,156}=4.029$; $P<0.05$; F5 C $53.67 \pm 2.03\%$ vs. D $44.88 \pm 1.08\%$; $F_{21,156}=4.029$; $P<0.05$), sin verse alterados los porcentajes de fibras lentas ni de intermedias con metabolismo predominantemente oxidativo. Por otra parte, en el F4 se presenta un incremento no significativo en el porcentaje de fibras rápidas (C $33.32 \pm 2.48\%$ vs D $42.25 \pm 4.00\%$; $F_{21,156}=4.029$; $P>0.05$) y un decremento no significativo en la proporción de fibras intermedias con predominancia de metabolismo oxidativo (C $45.21 \pm 0.91\%$ vs. D $36.06 \pm 3.97\%$; $F_{21,156}=4.029$; $P>0.05$). Estas observaciones permiten sugerir por un lado que la desnutrición crónica altera de manera diferente los porcentajes de los tipos de fibras presentes en los distintos fascículos que componen al músculo *EDL* de la rata joven (35 días de edad) y por otro lado, permiten proponer también que la desnutrición crónica induce la transformación de las fibras musculares de fenotipo rápido a uno intermedio (con metabolismo predominantemente glucolítico) (ver Discusión). Asimismo, las alteraciones en las proporciones de los distintos tipos de fibras permiten proponer la existencia de cambios en la distribución intramuscular y en la organización estructural de los fascículos de los músculos de *EDL* de las ratas desnutridas con respecto a los controles.

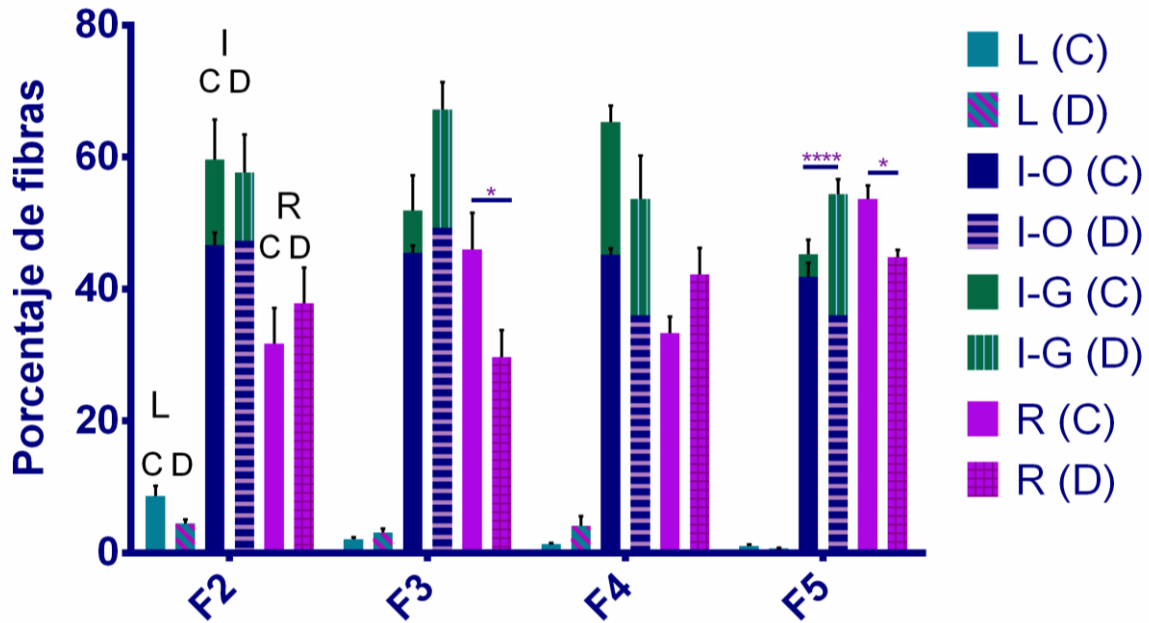


Figura 18. Los datos muestran la media \pm SEM. Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey ($F_{21,156}=4.029$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. $N=6$.

Ver Apéndice 10 para consultar las diferencias significativas de las todas comparaciones de los porcentajes de fibras por tipo y fascículo.

7.4. Organización fractal

7.4.1. Fibras clasificadas por la técnica de ATPasa

Las alteraciones en las proporciones de los distintos tipos de fibras permiten proponer la existencia de cambios en la organización fractal de los fascículos de los músculos *EDL* de las ratas desnutridas con respecto a los de las controles. Para analizar tal posibilidad en el presente estudio se utilizó el *prefactor de forma a* para determinar si el tipo de fibra presenta un comportamiento fractal. Con base al *prefactor de forma a* sólo las fibras rápidas e intermedias de ambos grupos presentan un comportamiento fractal ($0.1 < a < 4.0$) (Fig. 19).

El *prefactor de forma a* en el F2 para las fibras intermedias y rápidas no difirió tanto para el grupo control, como para el grupo desnutrido. Sin embargo, en ambos tipos de fibras el valor del *prefactor de forma a* aumentó en el grupo desnutrido, con respecto a los del grupo de animales control, aunque de manera no significativa (C I, 0.16 ± 0.03 vs. D I 0.20 ± 0.02 ; $F_{3,20}=1.66$; $P > 0.05$; C R, 0.12 ± 0.03 vs. D R, 0.21 ± 0.04 ; $F_{3,20}=1.66$; $P > 0.05$).

Para el F3 el valor de *prefactor de forma a* fue muy similar para las fibras intermedias y rápidas en el grupo control (I, 0.20 ± 0.03 vs. R; 0.22 ± 0.03 ; $F_{3,20}=1.55$; $P>0.05$), mientras que en el grupo desnutrido el valor de las fibras intermedias fue menor al de las fibras rápidas (I, 0.26 ± 0.03 vs. R, 0.38 ± 0.11 ; $F_{3,20}=1.55$; $P>0.05$). De manera similar al F2, en el F3 el valor de las fibras intermedias y rápidas en el grupo desnutrido aumenta, con respecto al de los controles, aunque de manera no significativa. En el F4 las fibras intermedias presentan un valor mayor al de las fibras rápidas en los animales control (I, 0.34 ± 0.10 vs. R, 0.27 ± 0.09 ; $H_3=3.24$; $P>0.05$); mientras que en el grupo de los desnutridos ambos valores son muy similares (I, 0.26 ± 0.04 vs. R, 0.25 ± 0.07 $H_3=3.24$; $P>0.05$). A diferencia del resto de los fascículos, en el F4 los valores de ambos tipos de fibras se ven disminuidos en el grupo desnutrido, con respecto al grupo control ($H_3=3.24$; $P>0.05$). En el F5 de los animales control, las fibras rápidas (0.25 ± 0.02) presentan un valor mayor que el de las fibras intermedias (0.17 ± 0.01 ; $P>0.05$); mientras que en grupo desnutrido los valores son muy parecidos entre ambos tipos de fibras (I, 0.29 ± 0.02 vs. R, 0.28 ± 0.02 ; $F_{3,20}=7.12$; $P>0.05$). Asimismo, se encontró un aumento significativo en el valor del *prefactor de forma a* en las fibras rápidas grupo desnutrido (0.27 ± 0.02) con respecto al control (0.25 ± 0.02 ; $F_{3,20}=7.12$; $P<0.01$) en el F5 (Fig. 19).

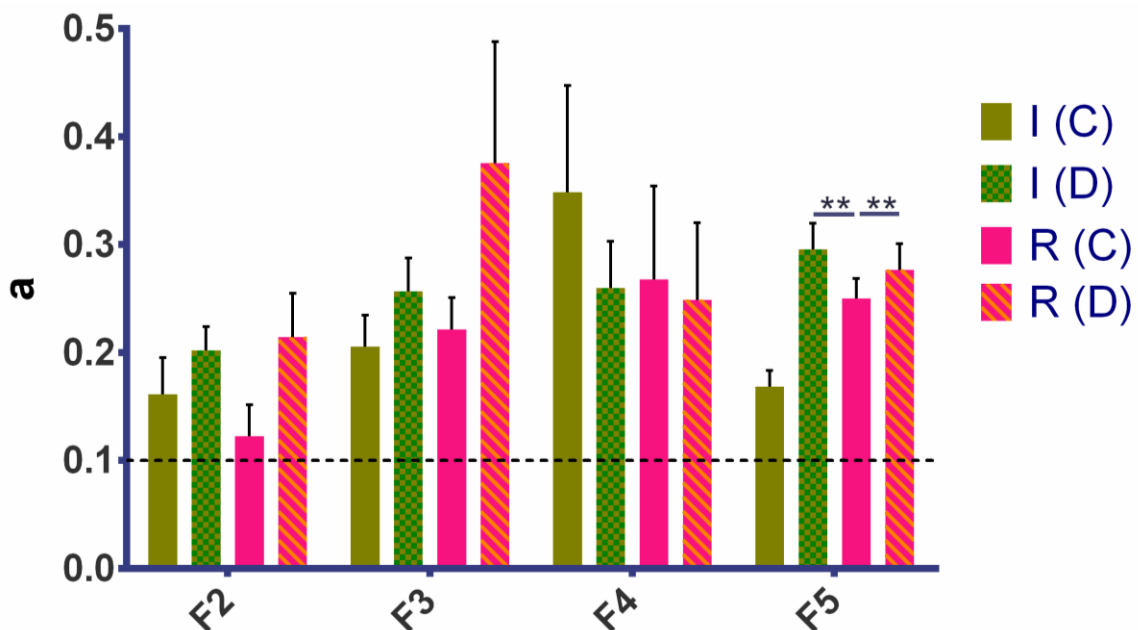


Figura 19. *Prefactor de forma a* de las fibras intermedias (I) y rápidas (R) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. EDL en el grupo control (C) y desnutrido (D). Línea punteada indica el valor mínimo para considerar comportamiento fractal de los datos. Los datos muestran la media \pm SEM. Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F2, $F_{3,20}=1.66$; F3, $F_{3,20}=1.55$; F5, $F_{3,20}=7.12$) y Kruskal-Wallis,

seguida de una prueba *post-hoc* de Dunn ($H_3=3.24$). * $P<0.05$; ** $P<0.01$. $N=6$, excepto F4 (D), donde $N=5$.

En general, el parámetro c tomó valores mayores a 0 y menores 10, excepto para las fibras intermedias del F4 en el grupo control (-2.71 ± 4.87), así como las fibras rápidas del F5 en el grupo control (-1.81 ± 1.66), estas última, también son menores a las fibras intermedias del mismo grupo ($R -1.81\pm 1.66$ vs. $I 6.65\pm 0.90$; $F_{3,20}=8.04$; $P<0.001$) (Fig. 20).

El parámetro c para el F2 de las fibras rápidas es mayor al de las fibras intermedias en el grupo control ($R 9.48\pm 0.56$ vs. $I 6.54\pm 1.00$; $F_{3,20}=2.85$; $P>0.05$) y a pesar de ocurrir lo mismo en el grupo desnutrido, la diferencia es mucho menor ($R 6.72\pm 0.54$ vs. $I 5.08\pm 1.01$; $F_{3,20}=2.85$; $P>0.05$), lo cual se ve como consecuencia que de ambos valores se reducen en el grupo desnutrido, respecto al control, pero de manera no significativa ($F_{3,20}=2.85$; $P>0.05$). En el F3 las fibras intermedias y rápidas tienen valores muy similares en el grupo de animales control ($I 5.70\pm 2.13$ vs. $R 5.50\pm 1.22$; $F_{3,20}=1.50$; $P>0.01$); sin embargo, en los animales desnutrido el valor para las fibras rápidas (8.00 ± 2.45) es mayor al de las fibras intermedias (1.44 ± 2.78 ; $F_{3,20}=1.50$; $P>0.05$). El valor del parámetro c se ve afectado diferencialmente por la desnutrición crónica en el F3, disminuyendo en las fibras intermedias y aumentando en las intermedias aunque no significativamente. Para el F4 el valor de las fibras intermedias es menor al de las fibras rápidas en tanto para el grupo control ($I 2.71\pm 4.87$ vs. $R 7.66\pm 1.22$; $H_3=5.76$; $P>0.05$) como para el grupo desnutrido ($I 2.02\pm 2.75$ vs. $R 4.98\pm 2.08$; $H_3=5.76$; $P>0.05$), pese a esto, las fibras intermedias aumentaron su valor de parámetro c ($H_3=5.76$; $P>0.05$), mientras que las rápidas lo disminuyeron con respecto al control ($H_3=5.76$; $P>0.05$). En el F5 el valor en las fibras intermedias (6.65 ± 0.90) es mayor al de las fibras rápidas (1.81 ± 1.66) en el grupo control; mientras que para el grupo desnutrido es mayor el valor de las fibras rápidas (0.75 ± 1.01) que el de las fibras intermedias (0.11 ± 1.42). Asimismo, se encontró una disminución significativa entre el grupo control y desnutrido con el valor del parámetro c de las fibras intermedias ($C 6.65\pm 0.90$ vs. $D 0.11\pm 1.42$; $F_{3,20}=8.04$; $P<0.01$) en el F5 (Fig. 20).

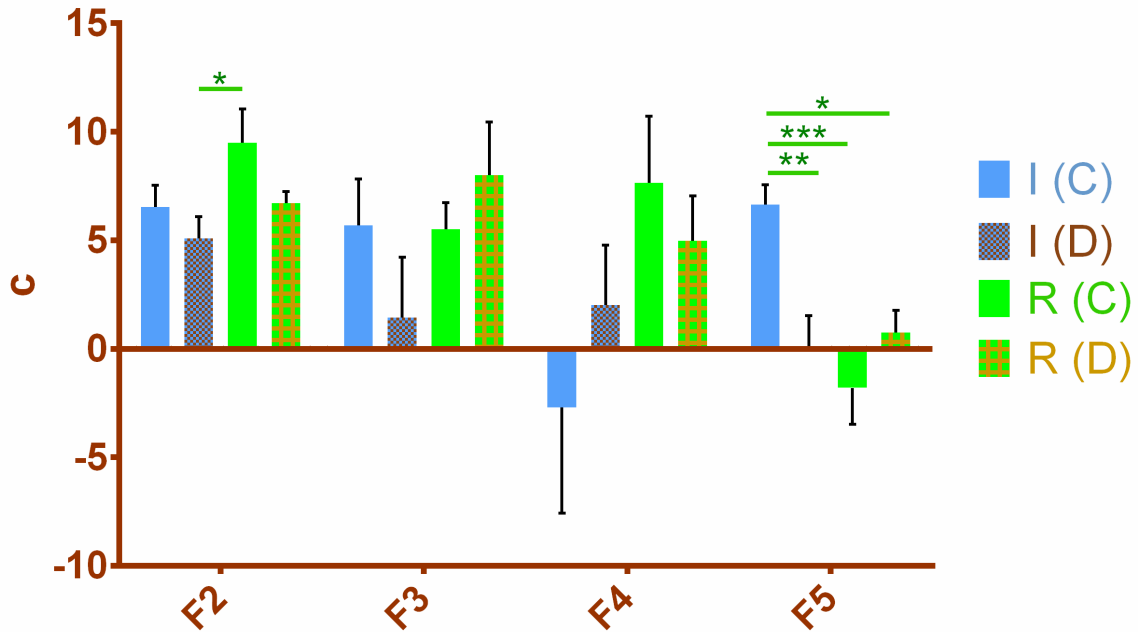


Figura 20. Parámetro c de las fibras intermedias (I) y rápidas (R) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Los datos muestran la media \pm SEM. Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F2, $F_{3,20}=2.85$; F3, $F_{3,20}=1.50$; y F5, $F_{3,20}=8.04$) y Kruskal-Wallis, seguida de una prueba *post-hoc* de Dunn (F4, $H_3=5.76$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. $N=6$, excepto F4 (D), donde $N=5$.

La dimensión fractal de las fibras intermedias y rápidas de los cuatro fascículos del m. *EDL* es mayor a 1 (valor mínimo: F3 C, rápidas 1.54 ± 0.08) y menor a 2 (valor máximo: F5 C, intermedias 1.84 ± 0.01) (Fig. 21), lo que determina que en ambos fenotipos existan grupos interconectados entre sí, es decir, que las fibras están dentro de grupos, los cuales están dentro de grupos más grandes y así sucesivamente hasta formar un solo grupo.

La desnutrición crónica provocó un decremento significativo en la dimensión fractal de las fibras rápidas del F3 (C 1.73 ± 0.03 vs. 1.54 ± 0.07 ; $F_{9,78}=2.17$; $P < 0.05$); sin embargo, siguen formando grupos de fibras interconectados entre sí (Fig. 21), lo cual quiere decir que si bien hay grupos dentro de grupos, estos pueden ser menores en número o en fibras dentro de los grupos. Esto puede traer como consecuencia igualmente cambios en la distribución de los tipos de fibra dentro de un fascículo y, por lo tanto, del músculo en su totalidad.

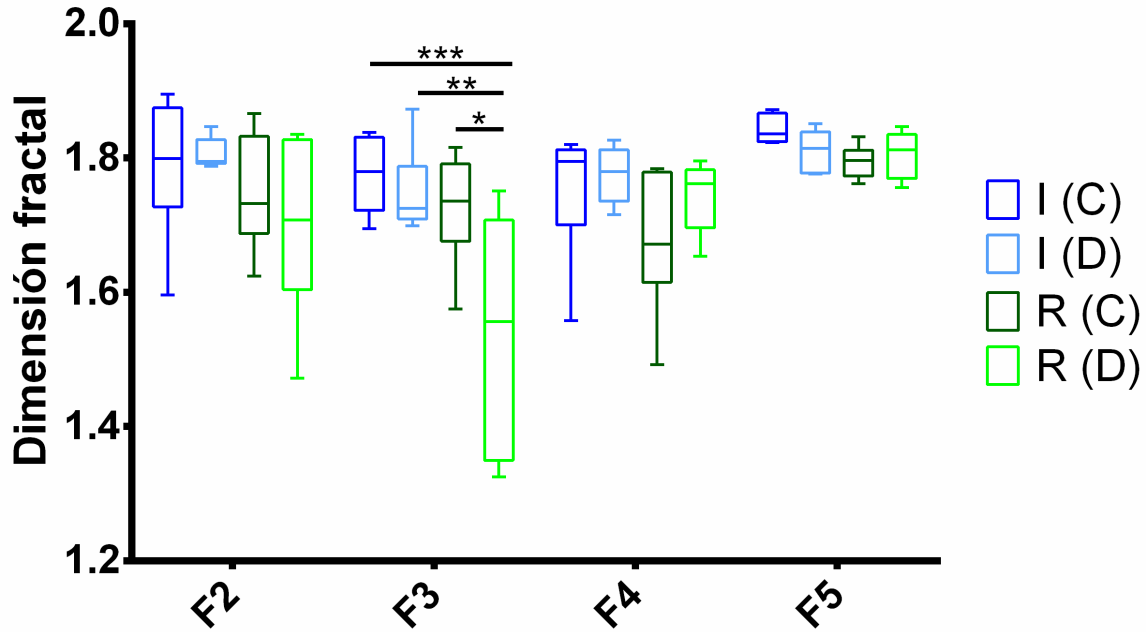


Figura 21. Dimensión fractal de las fibras intermedias (I) y rápidas (R) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Los datos muestran la mediana con los percentiles 25 a 75, así como el valor máximo y el valor mínimo. Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey ($F_{9,78}=2.17$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. $N=6$, excepto F4 (D), donde $N=5$.

Ver Apéndices 4 y 6 para consultar los valores de la dimensión fractal, prefactor de forma a y parámetro c de cada tipo de fibra en los fascículos de ambos grupos, así como las diferencias significativas de las todas comparaciones de la dimensión fractal.

7.4.2. Fibras clasificadas por la técnica de NADH

Las fibras oxidativas como las fibras glucolíticas en los cuatro fascículos del m. *EDL* en de ambos grupos presentan un valor de *prefactor de forma a* mayor a 0.1 y menor a 4, indicando que presentan comportamiento fractal y que puede aplicarse un análisis de fractalidad (Fig. 22).

En el F2 el *prefactor de forma a* para las fibras oxidativas es mayor que el de las fibras glucolíticas, tanto para los grupos control y desnutrido, aunque en el grupo desnutrido la diferencia entre los valores es menor (O 0.16 ± 0.02 vs. G 0.15 ± 0.02 ; $H_3=5.86$; $P > 0.05$) que la que existe entre el grupo control (O 0.21 ± 0.02 vs. G 0.17 ± 0.01 ; $H_3=5.86$; $P > 0.05$). Para el caso de los dos tipos de fibras se vio reducido en valor del *prefactor de forma a* en el grupo desnutrido. En el F3, al igual que en el F2, las fibras con

metabolismo oxidativo presentan un valor mayor al de las fibras glucolíticas, tanto en el grupo control, como en el desnutrido; sin embargo, en el grupo control la diferencia es menor (O 0.16 ± 0.03 vs. G 0.15 ± 0.03 ; $F_{3,20}=3.71$; $P>0.05$) que en el desnutrido (O 0.24 ± 0.02 vs. G 0.22 ± 0.01 ; $F_{3,20}=3.71$; $P>0.05$). En este fascículo la desnutrición crónica provocó que el valor de ambos tipos de fibras aumentara, con respecto al grupo control. A diferencia de los F2 y F3, en el F4 las fibras glucolíticas presentan un *prefactor de forma a* mayor al de las fibras oxidativas, tanto para los animales control (G 0.28 ± 0.07 vs. O 0.24 ± 0.05 ; $H_3=1.25$; $P>0.05$) como los desnutridos (G 0.24 ± 0.04 vs. O 0.23 ± 0.04 ; $H_3=1.25$; $P>0.05$). A causa de la desnutrición, el valor de ambos tipos de fibras disminuyó, aunque de menor forma en las fibras oxidativas. De manera similar al F4, en el F5 el valor de las fibras glucolíticas es mayor que el de las oxidativas, tanto en el grupo control (G 0.20 ± 0.02 vs. O 0.15 ± 0.02 ; $F_{3,20}=3.74$; $P>0.05$), como en el desnutrido (G 0.19 ± 0.02 vs. O 0.11 ± 0.02 ; $F_{3,20}=3.74$; $P>0.05$). Asimismo, el valor de ambos tipos de fibras se disminuye en el grupo desnutrido, respecto al control (Fig. 22).

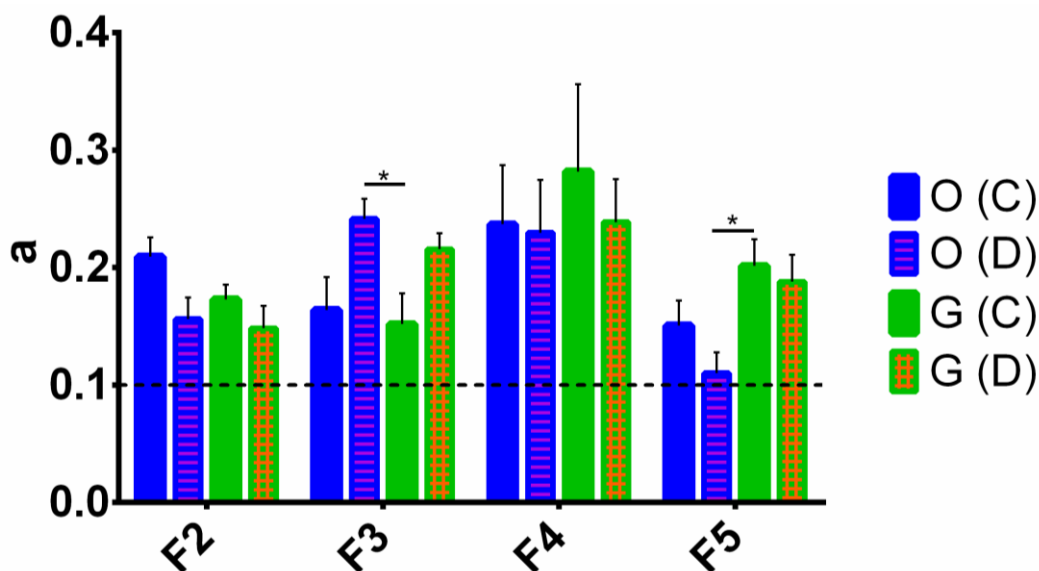


Figura 22. *Prefactor de forma a* de las fibras oxidativas (O) y glucolíticas (G) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Línea punteada indica el valor mínimo para considerar comportamiento fractal de los datos. Los datos muestran la media \pm SEM. Diferencias significativas ($P\leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F3, $F_{3,20}=3.71$; F5, $F_{3,20}=3.74$) y Kruskal-Wallis, seguida de una prueba *post-hoc* de Dunn (F2, $H_3=5.86$; F4, $H_3=1.25$). * $P<0.05$. $N=6$.

Los valores del parámetro *c* para las fibras clasificadas por su metabolismo en oxidativas y glucolíticas fueron mayores a 0, excepto para las fibras glucolíticas de los F4

(-2.32 ± 3.20) y F5 (-0.83 ± 0.91). El valor del parámetro c de las fibras oxidativas fue significativamente mayor al de las fibras glucolíticas en los F2 (O 10.52 ± 1.21 vs. G 6.06 ± 0.63 ; $F_{3,20}=9.96$; $P<0.05$), F4 (O 10.86 ± 0.79 vs. G 1.29 ± 2.45 ; $F_{3,20}=6.06$; $P<0.05$) y F5 (O 10.89 ± 0.87 vs. G 1.10 ± 1.41 ; $F_{3,20}=23.72$; $P<0.0001$) del grupo desnutrido, así como en el F5 del grupo control (O 8.12 ± 1.30 vs. G -0.83 ± 0.91 ; $F_{3,20}=23.72$; $P<0.001$). Comparando el valor del parámetro c del metabolismo de las fibras entre grupos (C y D) se encontró que éste aumentó en las fibras oxidativas (C 3.47 ± 0.56 vs. D 6.06 ± 0.63 ; $F_{3,20}=9.96$; $P<0.05$) con respecto al grupo control en el F2 (Fig. 23).

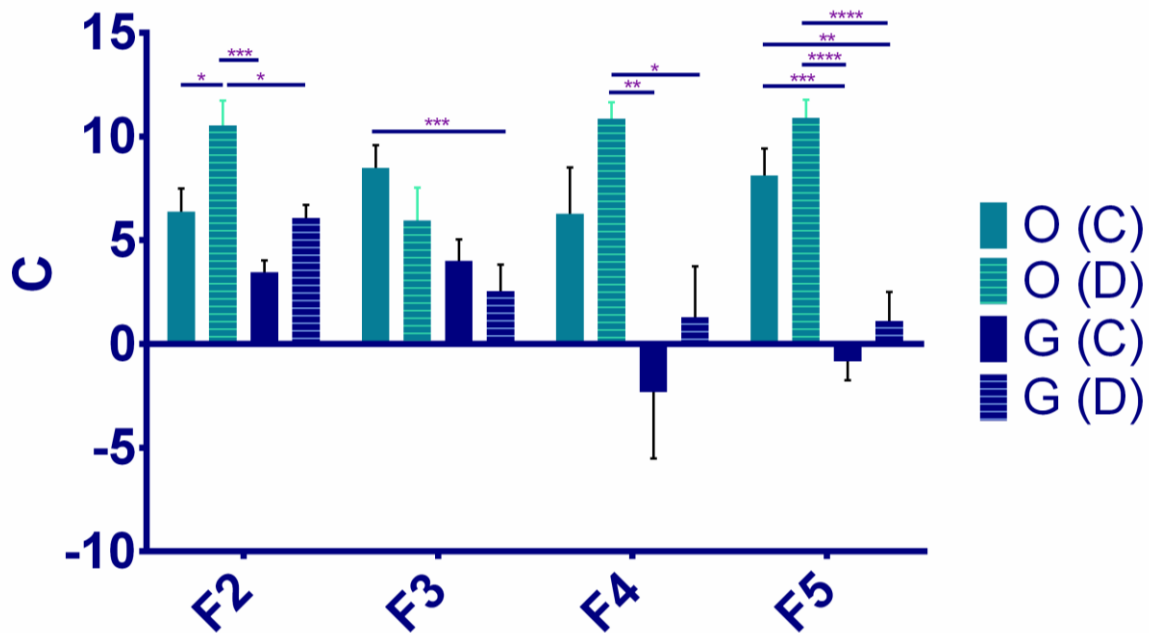


Figura 23. Parámetro c de las fibras oxidativas (O) y glucolíticas (G) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Línea punteada indica el valor mínimo para considerar comportamiento fractal de los datos. Los datos muestran la media \pm SEM. Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey (F2, $F_{3,20}=9.96$; F3, $F_{3,20}=4.17$; F4, $F_{3,20}=6.06$; F5, $F_{3,20}=23.72$). * $P<0.05$; ** $P<0.01$. $N=6$.

Las fibras oxidativas, así como las fibras glucolíticas en todos los fascículos y en ambos grupos se encuentran formando grupos interconectados, puesto que presentan una dimensión mayor a 1 (valor mínimo: F3 D, oxidativas 1.68 ± 0.04) y menor a 2 (valor máximo: F5 C, oxidativas 1.84 ± 0.01) (Fig. 24).

La organización fractal de las fibras glucolíticas y oxidativas no se ve afectada por la desnutrición crónica en ninguno de los fascículos del m. *EDL* (Fig. 24).

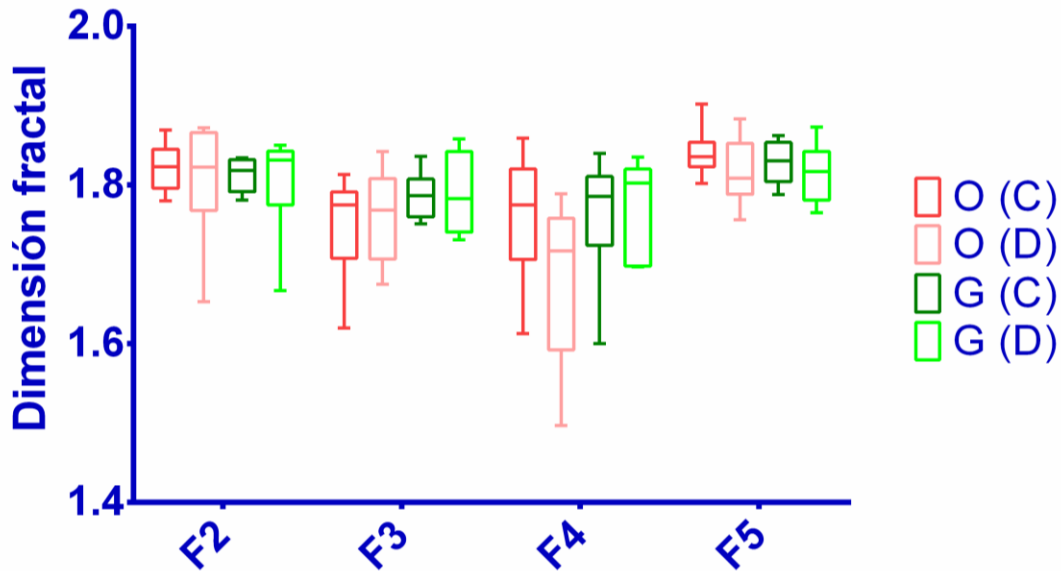


Figura 24. Dimensión fractal las fibras oxidativas (O) y glucolíticas (G) de los fascículos (F2, F3, F4, y F5) del m. *EDL* en el grupo control (C) y desnutrido (D). Los datos muestran la mediana con los percentiles 25 a 75, así como el valor máximo y el valor mínimo. Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey ($F_{9,80}=0.83$). $N=6$.

El análisis de correlación integral fractal permitió determinar que las fibras, clasificadas por la actividad de la ATPasa (excepto las fibras lentas) y por su metabolismo, se encuentran organizadas de una forma fractal, formando grupos interconectados, lo cual puede tener importancia sobre la función individual de cada fascículo, así como la función del músculo *EDL* completo. Asimismo, esta organización se ve alterada por la desnutrición crónica, pues los cambios en los porcentajes de las fibras se reflejaron en cambios en la organización, especialmente en las fibras rápidas del F3, los cuales puede tener repercusiones en los patrones de distribución de los tipos de fibras.

Ver Apéndices 7 y 9 para consultar los valores de la dimensión fractal, prefactor de forma a y parámetro c de cada tipo de fibra en los fascículos de ambos grupos, así como las diferencias significativas de las todas comparaciones de la dimensión fractal.

7.5. Patrones de distribución

A partir de las observaciones descritas en secciones previas, en las que se establece que la desnutrición crónica provoca cambios en las proporciones de los distintos tipos de fibras presentes en los fascículos de los músculos *EDL*, resulta factible suponer que la distribución intrafascicular de las mismas también presenta alteraciones de consideración. Para evaluar tal posibilidad, en el presente estudio se utilizó un análisis de funciones de distribución (descrito en la sección de Métodos), que permite evidenciar la posible distribución de los distintos tipos de fibras dentro de cada fascículo de los músculos *EDL* de las ratas jóvenes desnutridas con respecto a los controles

7.5.1. Fibras clasificadas por la técnica de ATPasa

En el F2, las fibras intermedias son las dominantes en la distribución, ya que se encuentra por prácticamente todo el fascículos, excepto en los extremos en donde se encuentran mayormente fibras rápidas (Fig. 25 A); sin embargo, la desnutrición provoca que esta disminuya, pues se ve interrumpida por la distribución de las fibras rápidas, las cuales ahora se encuentra no sólo en la periferia, sino en partes del centro, además que se forman regiones con predominancia de fibras lentas; asimismo, la distribución de las fibras intermedias se extiende cerca de los bordes del fascículo (Fig. 25 B). Igualmente, la desnutrición crónica causó que la altura de los picos de los cuadrantes se vea reducida, en comparación con los de los animales control. Los histogramas (Fig. 25 C) muestran que la desnutrición provocó que las fibras intermedias y rápidas sean menos frecuentes en el fascículo; mientras que las fibras lentas además de ser menos frecuentes, se encuentran en un menor porcentaje de cuadrantes.

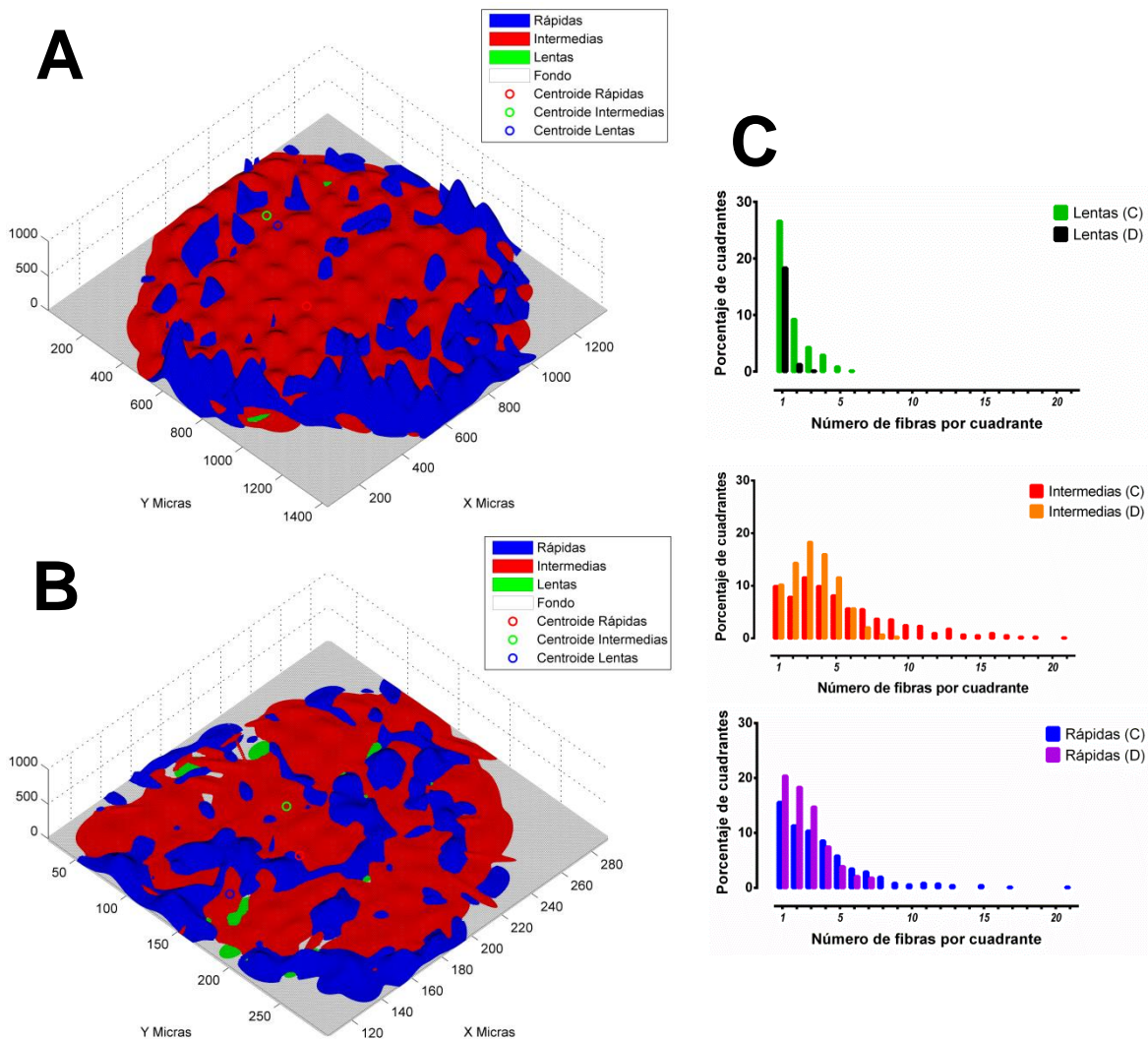


Figura 25. Mapas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas en el F2 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas del F2 para los grupos control (C) y desnutrido (D).

Con respecto a los F3 de los músculos *EDL* controles, los fascículos de los músculos desnutrido son lo que manifiestan mayores cambios en los patrones de distribución de las fibras. Eso es, mientras que en los fascículos control las fibras rápidas ocupan la mayor parte del fascículo (Fig. 26 A), en los fascículos desnutridos las fibras intermedias son las que predominan (Fig. 26 B), principalmente en regiones centrales del fascículo, quedando las fibras del tipo rápido sólo en la periferia. Asimismo, se puede observar en la figura que se incrementa la presencia de fibras lentas y que la densidad de fibras rápidas es menor. Lo anterior puede observarse con mayor claridad en el histograma inferior de la Figura 26 C, los cuadrantes con menor cantidad de fibras rápidas

se vuelven más frecuentes en los fascículos de los animales desnutridos, con respecto a los desnutridos.

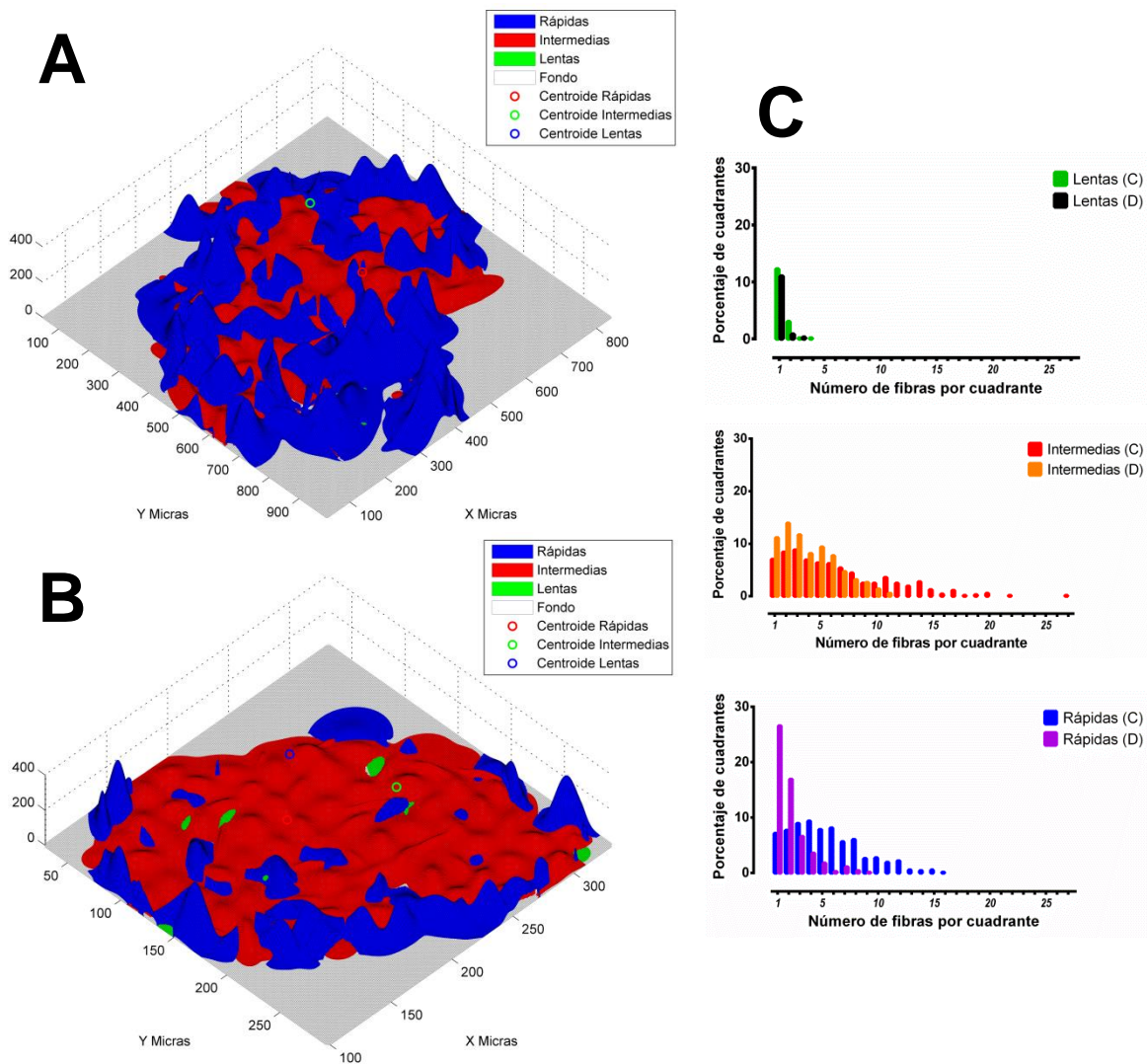


Figura 26. Mapas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas en el F3 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas del F3 para los grupos control (C) y desnutrido (D).

A primera vista, los mapas de distribución de densidad de fibras de los distintos tipos para el F4 de los músculos *EDL* control y desnutridos no muestran gran diferencia entre sí, ya que en los fascículos control (Fig. 27 A) como en el desnutrido (Fig. 27 B) se observan un mayor número de cuadrantes con predominio de fibras intermedias que de rápidas. Sin embargo, los histogramas de la Figura 27 C ilustran la presencia de un mayor

número de cuadrantes con menor densidad de fibras lentas, intermedias y rápidas, con respecto a los fascículos control.

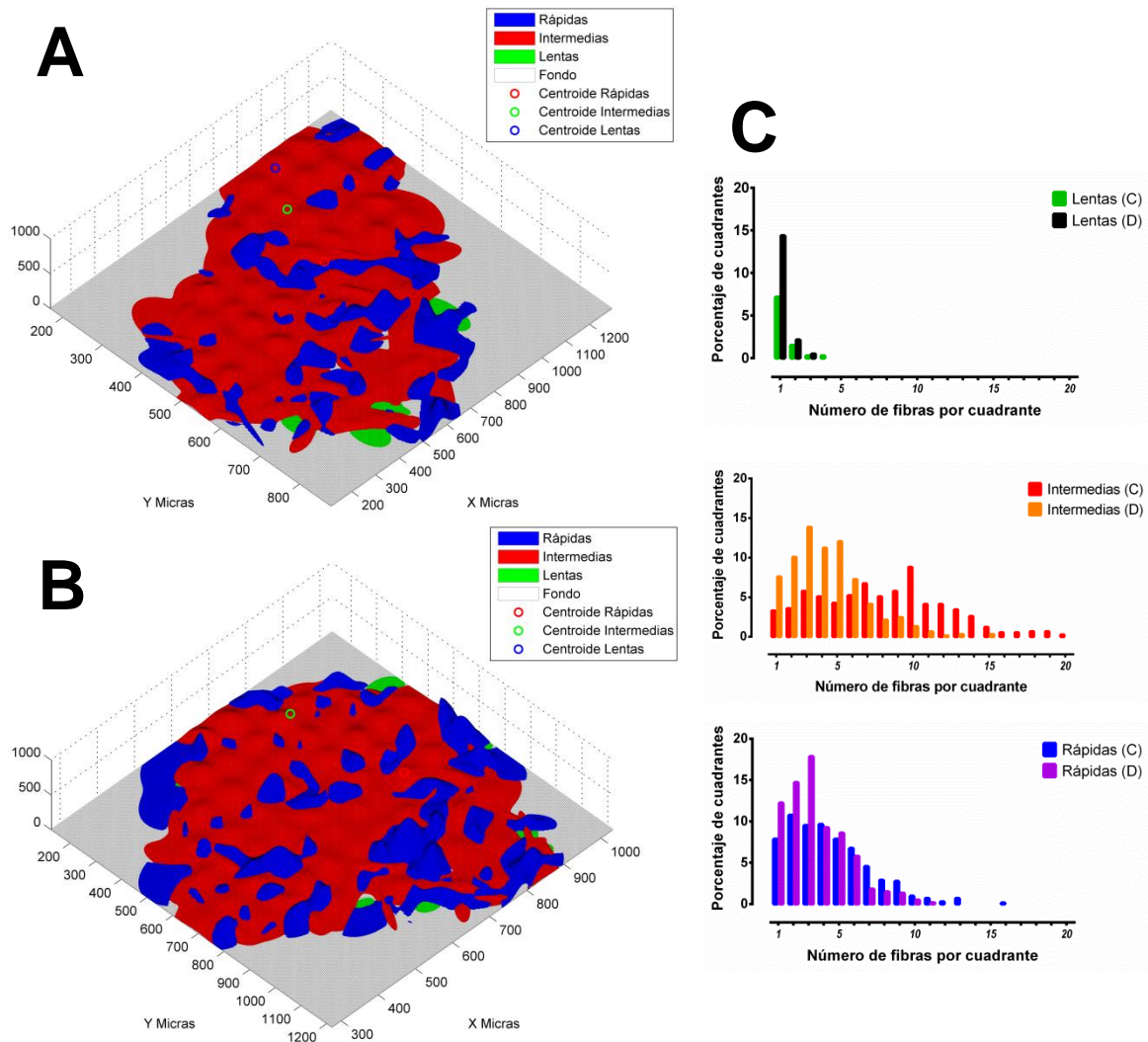


Figura 27. Mapas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas en el F4 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas del F4 para los grupos control (C) y desnutrido (D).

Con respecto al F5, las gráficas A y B de la Figura 28 muestran que las fibras rápidas se encuentran concentradas en regiones centrales de los fascículos, mientras que las fibras intermedias se localizan en la periferia, tanto en los fascículos controles, como en los desnutridos. Asimismo, los histogramas muestran que no hay grandes alteraciones en la densidad de fibras por cuadrante, con ninguno de los tres tipos de fibra (Fig. 28 C).

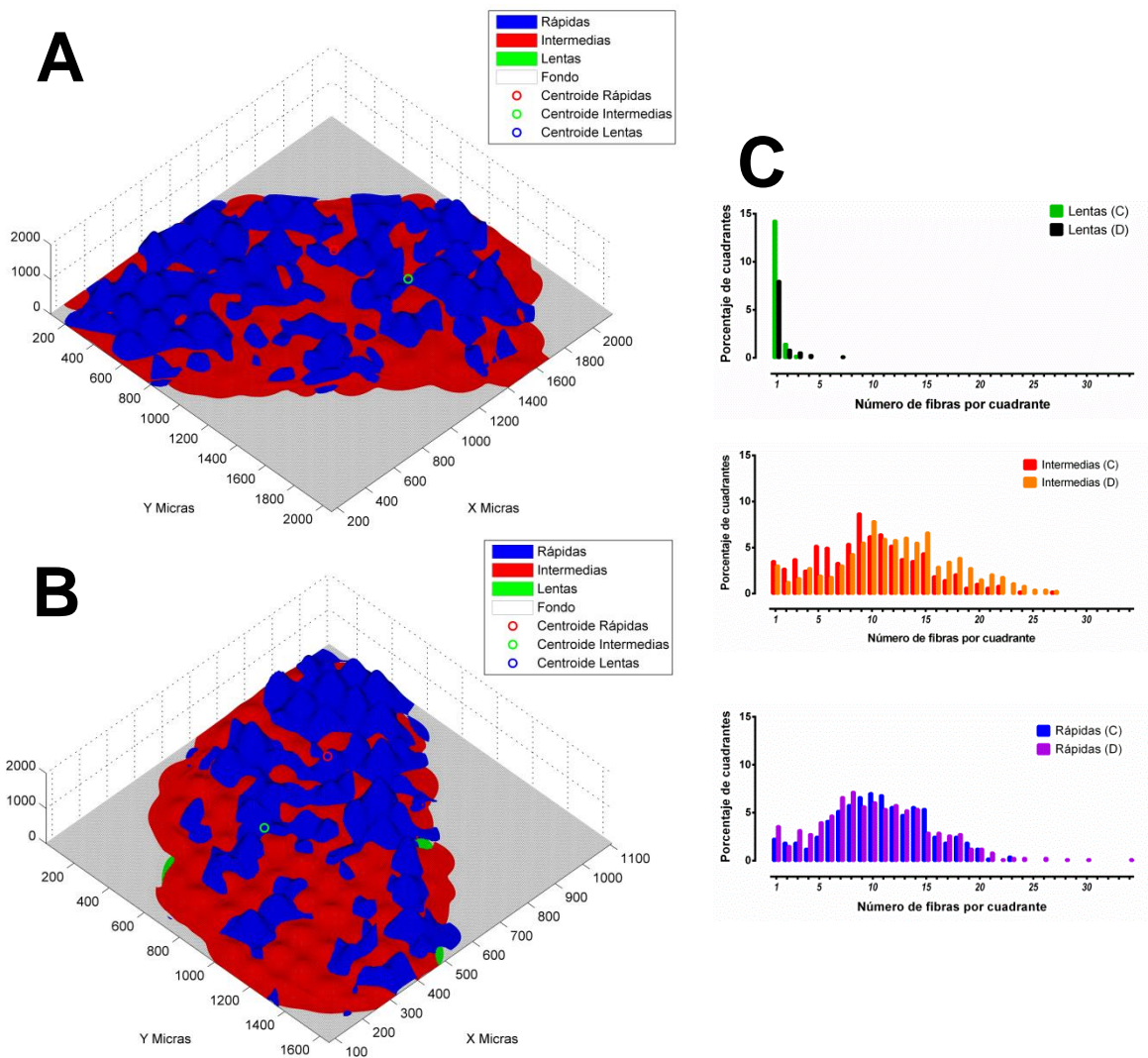


Figura 28. Mapas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas en el F5 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras lentas, intermedias y rápidas del F5 para los grupos control (C) y desnutrido (D).

7.5.2. Fibras clasificadas por la técnica de NADH-TR

Las fibras con metabolismo oxidativo y las fibras con metabolismo glucolítico en el F2 del grupo control se encuentran formando un patrón de mezcla de fibras oxidativas y glucolíticas, con una ligera predominancia de las fibras con metabolismo oxidativo (Fig. 29 A); mientras que en el grupo desnutrido, el patrón tiende a ser mayormente fibras glucolíticas; asimismo, los picos (densidad de fibras en el cuadrante) se vuelven más bajos en el grupo desnutrido con respecto al control (Fig. 29 B). Finalmente, los histogramas muestran que para el grupo desnutrido tanto las fibras oxidativas, como las

fibras glucolíticas se sesgan a la izquierda, por lo que en cada cuadrante se encuentra una menor cantidad de fibras (Fig. 29 C).

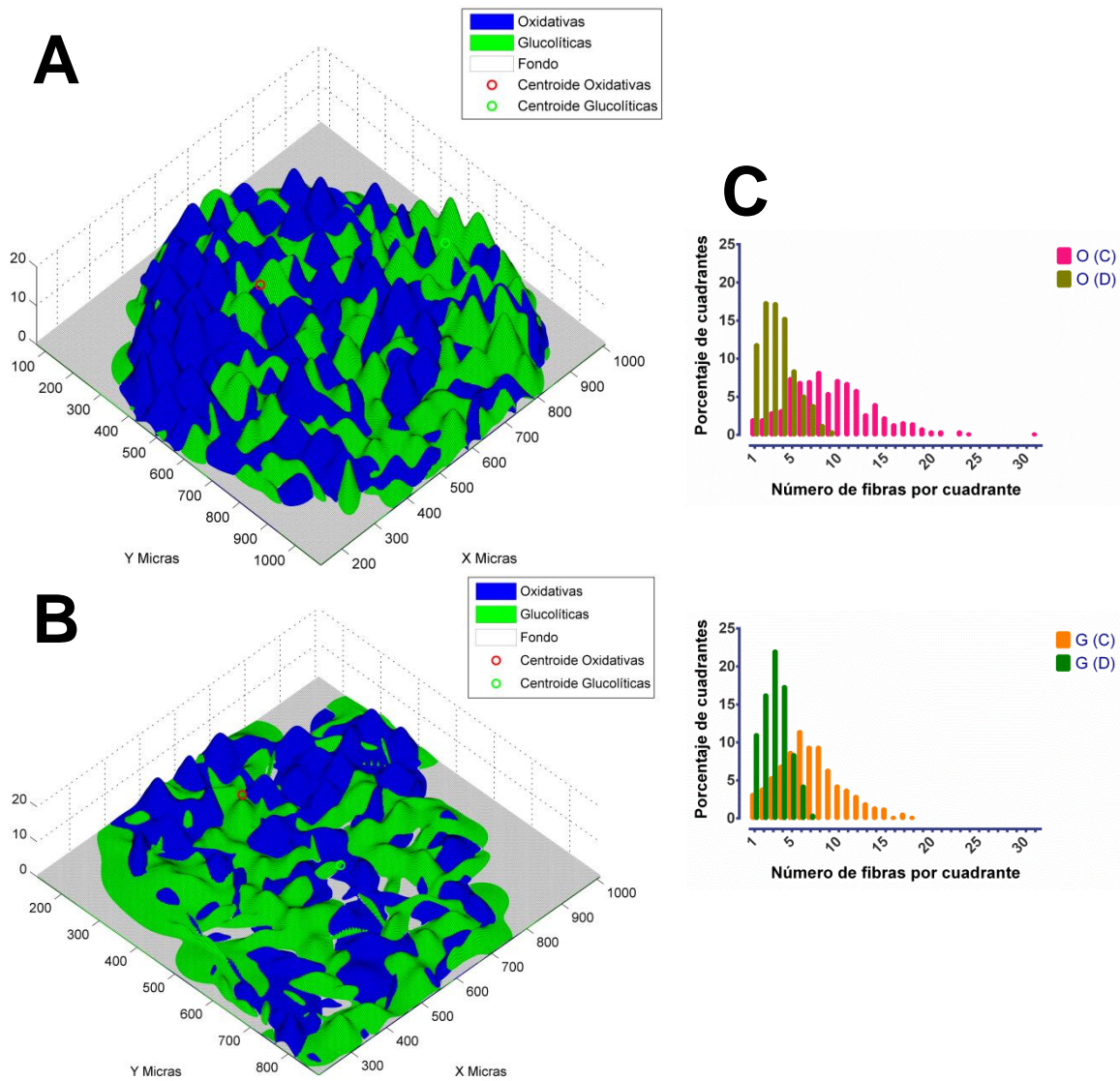


Figura 29. Mapas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas en el F2 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas del F2 para los grupos control (C) y desnutrido (D).

En el F3 del grupo control, las fibras glucolíticas predominan, mientras que las fibras oxidativas se encuentran más hacia uno de los extremos (Fig. 30 A); sin embargo, en el grupo desnutrido se observa un incremento en la proporción de fibras oxidativas, quedando las fibras glucolíticas casi exclusivamente en el centro del fascículo (Fig. 30 B). Los histogramas de la Figura 30 C muestran que las fibras oxidativas y glucolíticas en el

grupo control tienen una distribución similar, lo mismo sucede para el grupo desnutrido, en el que ambos tipos de fibras tienden a situarse ligeramente a la derecha, con respecto al grupo control.

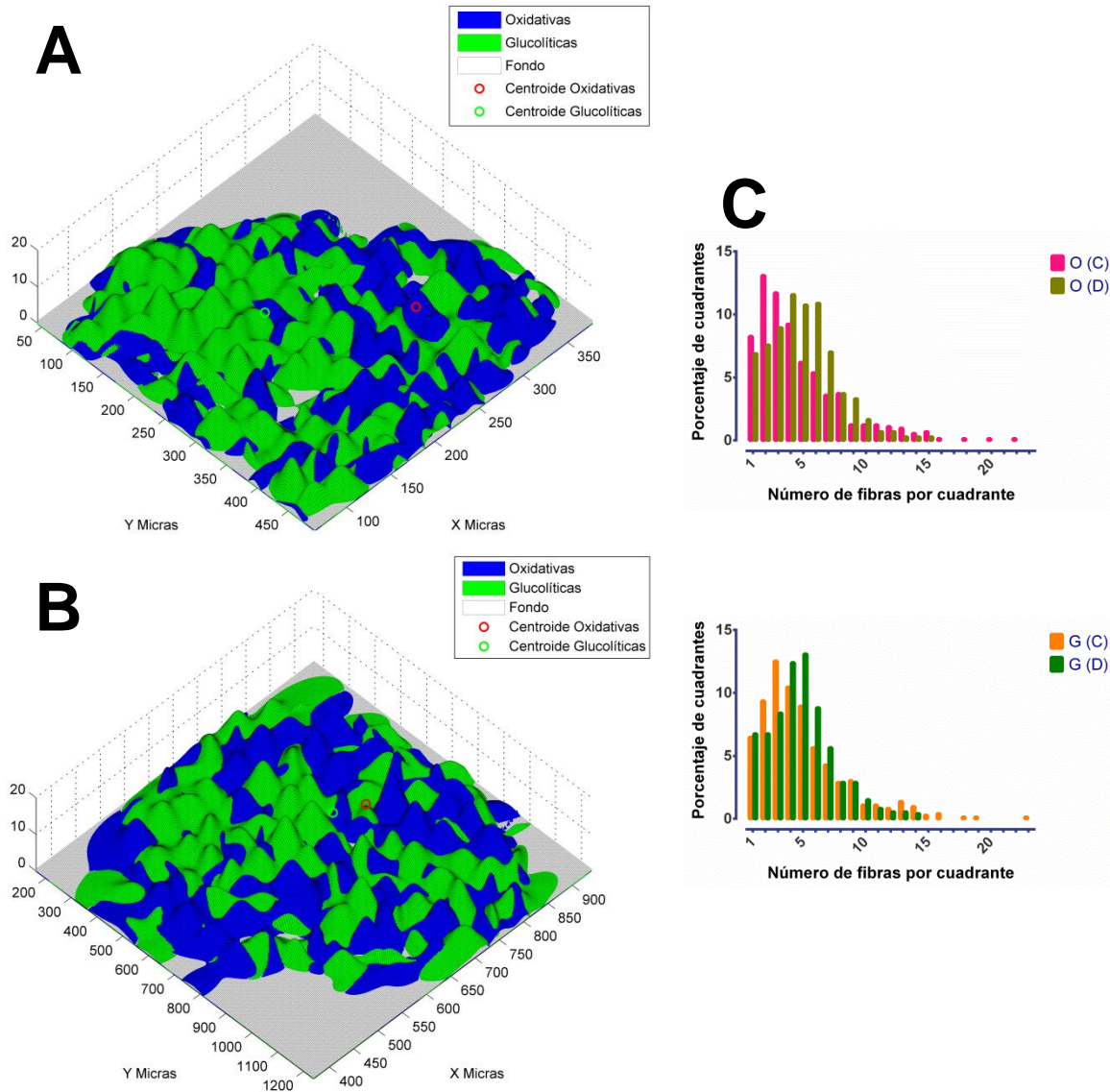


Figura 30. Mapas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas en el F3 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas del F3 para los grupos control (C) y desnutrido (D).

En el F4 de los músculos control, las fibras glucolíticas son el tipo predominante, mientras que las fibras oxidativas se encuentran dispersar dentro del fascículo, con una mayor concentración en uno de los extremos (Fig. 31 A). Sin embargo, en el grupo

desnutrido se ve alterada el patrón de distribución de las fibras oxidativas, las cuales se sitúan en la periferia del fascículo; asimismo, los picos de mayor densidad de fibras tienden a ser menores (Fig. 31 B). La distribución de los histogramas de ambos tipos de fibras se presenta un sesgo hacia la izquierda, por lo que hay muchos cuadrantes que tienen pocas fibras, en comparación con las halladas en el grupo control (Fig. 31 C).

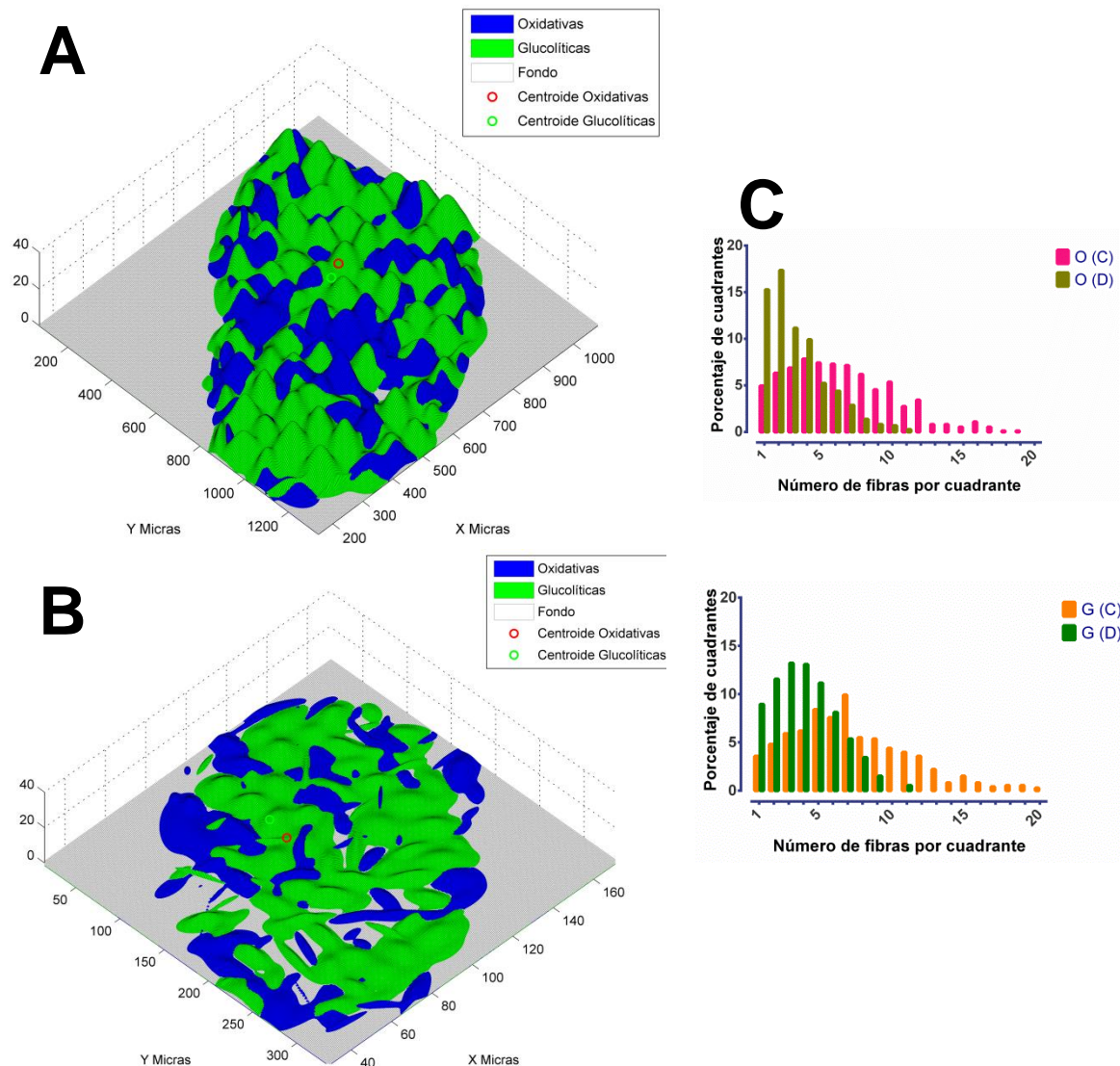


Figura 31. Mapas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas en el F4 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas del F4 para los grupos control (C) y desnutrido (D).

La distribución de las fibras glucolíticas y oxidativas en el F5, tanto para el grupo control (Fig. 32 A), como para el grupo desnutrido (Fig. 32 B) es muy similar, hallándose

con fibras oxidativas en la periferia y en ciertas partes del centro del fascículo; sin embargo, los picos son más bajos, debido a que hay una menor densidad de fibras que en el grupo control, lo cual es evidente con los histogramas (Fig. 32 C), ya que ambos tipos de fibras se sesgan ligeramente a la izquierda, por lo que por cuadrante, en los fascículos de los animales desnutridos, se encuentra una menor densidad de fibras.

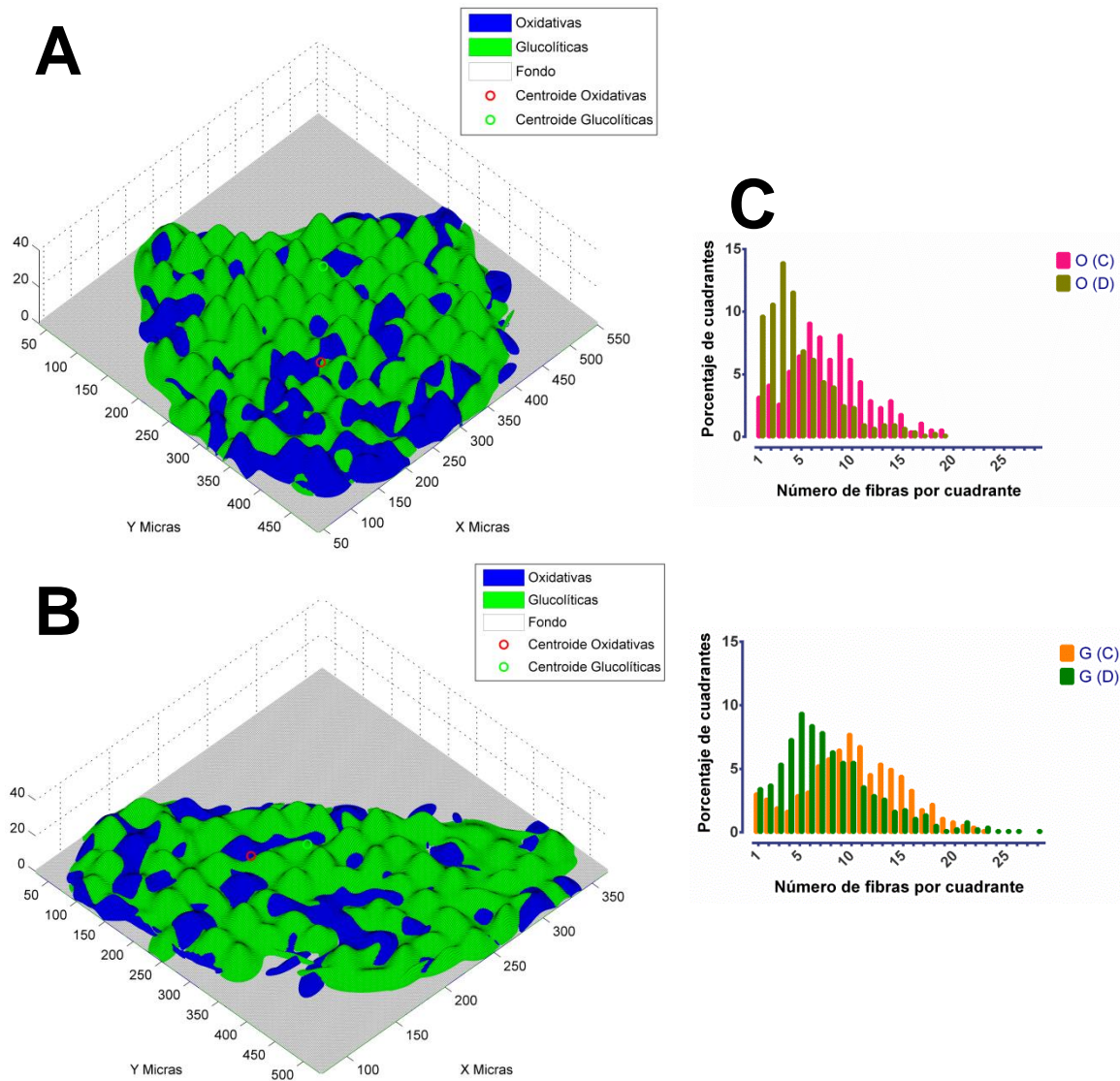


Figura 32. Mapas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas en el F5 del grupo control (A) y grupo desnutrido (B). C. Histogramas de distribución de las fibras oxidativas y glucolíticas del F5 para los grupos control (C) y desnutrido (D).

El análisis de funciones de distribución de densidades permite determinar que las fibras, clasificadas con ambas técnicas histoenzimáticas, presentan una distribución

diferente de fascículo a fascículo, la cual se ve alterada debido a los cambios en los porcentajes de fibras y organización fractal provocados por la desnutrición crónica.

8. DISCUSIÓN

Con base a los datos aquí presentados se puede observar que tanto el bajo peso corporal, como el bajo peso de los músculos de *EDL* indican que los animales se encontraban desnutridos crónicamente y concuerdan con otros valores reportados (Segura *et al.*, 2001; Ruíz-Rosado *et al.*, 2013; Pereyra-Venegas *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la desnutrición crónica afecta de manera diferencial la expresión del metabolismo y de la actividad de la ATPasa de las fibras contenidas en los distintos fascículos del músculo *EDL* de la rata joven (de 35 días de edad postnatal) y que tales alteraciones provocan cambios en la organización fractal y patrones de distribución de las fibras en los fascículos.

8.1. Composición de los fascículos del m. *EDL*

Diversos estudios muestran que el m. *EDL* en condiciones normales está compuesto por un alto porcentaje de fibras de tipo intermedio, conjuntamente con un porcentaje menor de fibras rápidas y muy pocas lentas (Toscano *et al.*, 2008; Ruíz-Rosado *et al.*, 2013). Los resultados aquí obtenidos permiten establecer que tales porcentajes no se aplican en el caso de los distintos fascículos que componen a tal músculo. En el caso del fascículo F5, éste posee un mayor porcentaje de fibras rápidas, seguidas de intermedias y muy pocas lentas, similar a los hallado por Pereyra-Venegas *et al.* (2015) en el músculo completo; mientras que el resto de los fascículos (F2, F3 y F4) presentan mayormente fibras del tipo intermedias, seguidas de fibras rápidas y finalmente fibras lentas, aunque no en los mismos porcentajes. Es por ello que es importante el muestreo y análisis de una región de una región óptima del m. *EDL* si se va a analizar completo, ya que las alteraciones particulares que sufre cada fascículo frente a un estímulo (ej. desnutrición crónica) puede ser diferencial y tener consecuencias específicas en su función.

Las fibras musculares pueden presentar un metabolismo, ya sea oxidativo o glucolítico, el cual depende del sustrato que utilicen como fuente de energía. En cuanto a esta característica de las fibras, en este trabajo se encontró que los F3, F4 y F5 el metabolismo predominante es el glucolítico, a diferencia del trabajo de Ruíz-Rosado *et al.* (2013), quienes encontraron un mayor porcentaje de fibras con metabolismo oxidativo en el músculo completo, lo cual coincide con lo hallado en los fascículos, pero con la tinción de COX, utilizada igualmente por ellos, excepto para el F4, donde hay un predominio de

fibras glucolíticas (datos no publicados). Esto podría deberse a la técnica histoquímica empleada para determinar el metabolismo de las fibras. Existen varias técnicas histoquímicas empleadas para determinar el metabolismo, dependiendo de la actividad del complejo de la cadena respiratoria que se quiera evaluar, entre ellas se encuentran la de NADH-TR, COX y SDH (Pette y Staron, 1997). En este trabajo se utilizó la técnica de NADH-TR, la cual evalúa la actividad del primer complejo; es probable que la actividad del segundo complejo donde participa la citocromo oxidasa (COX) responda de manera diferente a un mismo factor, por lo que los resultados podrían variar. Otra causa de las diferencias podría ser debido a que la parte media del músculo completo, de donde fueron obtenidos los cortes no es representativa si consideramos que la composición de cada fascículo es diferente, independientemente de la condición.

En cuanto al metabolismo de las fibras intermedias en todos los fascículos del m. *EDL* el metabolismo predominante fue el oxidativo, lo cual puede brindarle al músculo un mejor funcionamiento para realizar diversas actividades, esto debido a las características de este tipo de fibras (Zierath y Hawley, 2004; ver Tabla 2).

8.2. Efecto de la desnutrición crónica sobre la composición de los fascículos del m. *EDL*

8.2.1. Histoquímica para ATPasa alcalina (pH 9.4)

Los fascículos del m. *EDL* a pesar de tener una composición diferente entre ellos, en todos existe un predominio de fibras tipo II, por lo cual se pueden considerar como equivalentes a músculos rápidos, por lo que como era esperado, fueron afectados por la desnutrición, pues como ha sido demostrado (Howells *et al.*, 1978; White *et al.*, 2000; Kim, 2012), la desnutrición no provoca cambios en el fenotipo de las fibras de músculos de contracción lenta (p. ej. m. sóleo), pero sí en aquéllos de contracción rápida (p. ej. m. *longissimus*), esto debido al origen ontogenético de los tipos de fibras, pues las fibras lentas (tipo I) se forman de la población de fibras primaria; mientras que las fibras tipo II lo hace de la población secundaria (Kelly y Rubinstein, 1980; Ward y Stickland, 1991). Sólo esta población secundaria de miotubos es sensible a variables ambientales, entre ellas, la desnutrición, ya que ésta reduce las tasas de proliferación de mioblastos y la fusión de éstos (Wilson *et al.*, 1988).

A diferencia de Ruíz-Rosado *et al.* (2013), donde se muestra un aumento de fibras intermedias con un decremento de fibras rápidas, en este trabajo se pudo observar que

sólo ocurre en los fascículos F3 y F5; mientras que los F2 y F4 presentan un aumento de fibras rápidas con el respectivo decremento de fibras intermedias, mismo que concuerda con lo hallado por Toscano *et al.* (2008) y Pereyra-Venegas *et al.* (2015) en los m. *EDL* completos; sin embargo, los protocolos de alimentación fueron distintos entre el primero (desnutrición crónica) y el segundo (desnutrición prenatal), lo cual puede influir en esta contrariedad. Pero en el caso del primero y el tercero, donde el protocolo es el mismo (desnutrición crónica), la diferencia encontrada puede deberse al parte del músculo donde se realizó el muestreo, pues como se menciona en el presente trabajo, los cuatro fascículos no presentan la misma composición de tipos de fibras y parece ser que se tomaron diferentes proporciones de los fascículos al realizar los cortes la parte medial, quizá tomando mayor parte del fascículo F3 en el de Ruíz-Rosado *et al.* (2013), mientras que en el del Pereyra-Venegas *et al.* (2015) se tomó mayor parte del fascículo F4.

Asimismo, Howells *et al.* (1978) reportaron un aumento de fibras rápidas debido a desnutrición (pre- y perinatal; muy parecida a la utilizada en este trabajo) en el músculo tibial anterior (m. TA), considerado también como un músculo rápido, pero con una composición distinta al m. *EDL*, pues el m. TA presenta casi el mismo porcentaje de fibras IIa que IIb (IIa 50.00%, IIb 45.55%; Tasić *et al.*, 2003); mientras que el m. *EDL* los porcentajes de ambos tipos son menos similares (IIa ~65%, IIb ~30%; Ruíz-Rosado *et al.*, 2013), lo cual puede sugerir que el porcentaje de fibras IIa y IIb y no sólo del porcentaje entre fibras I y II presentes en un músculo influye sobre la dirección en la transición y debido a que cada fascículo presentó una composición distinta de los fenotipos de fibras intermedias y rápidas, podría tener relevancia en la dirección de la transición de los fenotipos de fibras.

Otra característica que puede influir en la transición es la dirección en que ocurre el cambio de tipos de fibras en el desarrollo ontogenético, pues en el m. *EDL* ocurre de fibras rápidas (IIb) a fibras intermedias (IIa), las cuales se forman hasta después de las primeras dos semanas postnatales, por lo cual, el mayor porcentaje, aunque no significativo, de fibras rápidas en los F2 y F4 del grupo desnutrido con respecto al control, podría tratarse de un retraso en la conversión hacia fibras intermedias; pues como se ha observado con la desnutrición crónica (Ruíz-Rosado *et al.*, 2013), al llegar a la edad adulta ya no existen diferencias en los porcentajes de las fibras con respecto a animales bien nutridos.

8.2.2. Tendencia y magnitud del cambio en la expresión fenotípica de los distintos tipos de fibras en los fascículos de los músculos *EDL* desnutridos

Cada fascículo presentó una dirección e intensidad de cambio diferente en respuesta a la desnutrición crónica. Como se muestra en la Figura 33 el mayor cambio se da de fibras rápidas a fibras intermedias glucolíticas en el F3; mientras que las fibras lentas del F5 son el tipo que menos se ve afectado. Asimismo, como se ve observa en los fascículos F2 y F3 ocurrió una transición hacia fibras del tipo intermedio oxidativo; mientras que en el fascículo F4 ocurrió hacia de fibras lentas, lo cual es una forma en que se logró mantener al metabolismo oxidativo. En cambio en el fascículo F5 se da una transición desde las fibras intermedias oxidativas y desde las fibras rápidas hacia las fibras intermedias glucolíticas, dándose un cambio mucho mayor en la transición de fibras intermedias oxidativas a intermedias glucolíticas, pues hubo alteraciones en la maquinaria metabólica para pasar de un metabolismo oxidativo a uno glucolítico.

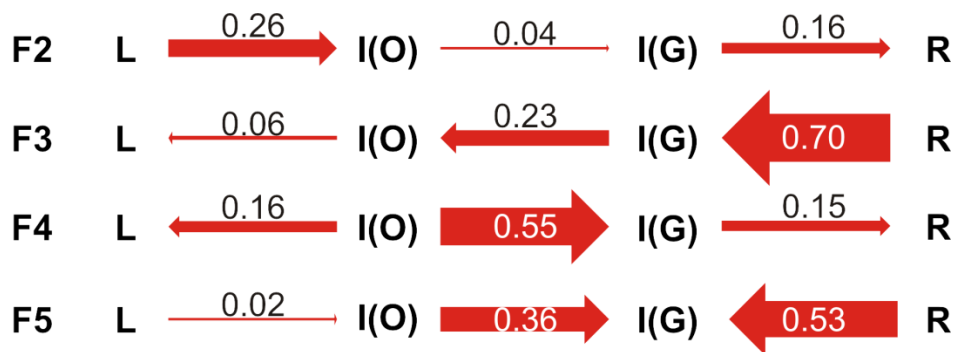


Figura 33. Dirección e intensidad de cambio fenotípico de los tipos de fibras (Lentas L, Intermedias oxidativas IO, Intermedias glucolíticas IG y Rápidas R) en los fascículos (F2, F3, F4 y F5) del m. *EDL*, en ratas macho de 35 días de edad postnatal, provocado por la desnutrición crónica. En la sección de Metodología se describe la elaboración de este diagrama.

La transición de un tipo de fibra muscular a otro puede ser influenciada por diversas causas hormonales. Durante el desarrollo postnatal temprano, suceden cambios que parecen estar asociados con los niveles, principalmente, de las hormonas tiroideas (Agbulut *et al.*, 2003), ya que tanto en ratas (Dubois y Dussault, 1976) como en ratones (d'Albies *et al.*, 1987), los niveles de estas hormonas alcanzan sus niveles máximo hasta pasados unos días después del nacimiento. La desnutrición es un factor que altera el correcto funcionamiento de la glándula tiroidea (hipotiroidismo), lo cual puede tener

repercusiones en el corto plazo (Ayala-Moreno *et al.*, 2013) o en el largo plazo (Johnsen *et al.*, 2013), asociadas con la obesidad y las enfermedades metabólicas, debido a un cambio epigenético (programación fetal) de los receptores de hormonas tiroideas, lo cual tiene una gran relevancia para las fibras musculares, pues es uno de los principales factores capaces de modificar el fenotipo y como se mencionó anteriormente, en el m. *EDL* son estas hormonas las que ayudan a que las fibras realicen la transición del estado juvenil al estado adulto.

Las hormonas tiroideas son una de las principales hormonas que logran cambiar la expresión de isoforma de MHC, de manera diferencial al tejido, al grado de que en músculo la expresión de MHC tipo IIa es aumentada en músculos lentos, mientras que en músculos rápidos, se disminuye su expresión por el hipertiroidismo. En el m. *EDL* no se ve afectada ni por hipo- ni hipertiroidismo la expresión de MHC tipo IIb; sin embargo, la expresión de MHC tipo IIa se ve aumentada por el hipotiroidismo (Izumo *et al.*, 1986; Mahdavi *et al.*, 1987). Esto último tiene gran relevancia en este estudio, pues en los fascículos F3 y F5 se halló un mayor porcentaje de fibras intermedias (IIa), lo que podría indicar que la desnutrición crónica provoca un ambiente de hipotiroidismo, lo que ha sido analizado por Ayala-Moreno *et al.* (2013).

Pero a su vez, esto provoca una duda de por qué en los F2 y F4 no sucede la transición de fibras rápidas a intermedias de manera similar a los F3 y F5, si es probable que el nivel sérico de las hormonas tiroideas es bajo en los individuos del grupo desnutrido (por lo cual, se recomienda en evaluar esto en trabajos posteriores); esto quizá pueda ser explicado por los receptores a estas hormonas en cada uno de los fascículos, pues White *et al.* (2001) mostraron que el tipo (principalmente TR α 1 y TR α 2) y cantidad de receptores a las hormonas tiroideas va cambiando durante el desarrollo, así como también que éstos se encuentran en distintas proporciones en cada músculo, lo cual puede influir en la expresión del fenotipo de las fibras, pues un aumento en la proporción de uno de los dos receptores las puede volver más o menos sensibles a las hormonas. Lo cual fue observado por Swoap *et al.* (1994) en músculo cardíaco después de una privación energética crónica, donde disminuyeron los receptores de hormonas tiroideas, provocando un efecto similar al observado en hipotiroidismo, aunque los niveles de hormonas no estaban afectados. En los músculos rápidos, como el m. *longissimus* se ha encontrado que poseen una mayor cantidad de receptores TR α 1; mientras que en lentos, como el m. sóleo, se hallan más TR α 2 (White y Dauncey, 1999); sin embargo, la

desnutrición causa que se dupliquen los receptores TR α 2 en el m. *longissimus* (Dauncey *et al.*, 2001), receptores que de acuerdo con White *et al.* (2001) vuelven menos sensibles a las hormonas tiroideas, lo cual promueve la transición a fibras lentas (Izumo *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 2014), además que como consecuencia se reduce los receptores TR α 1, lo cual también está asociado con la transición a fibras lentas (Yu *et al.*, 2000). Esto parece indicar que una posible respuesta a dicha cuestión se debe a los receptores, ya sea en el tipo o cantidad, alterando la expresión de éstos debido a la desnutrición crónica, lo cual aunado a lo reportado de bajos niveles de hormonas tiroideas contribuye a que los fascículos respondan de manera diferencial a la desnutrición crónica. Así en los fascículos F3 y F5 a pesar del ambiente hipotiroideo, podría darse un aumento en receptores de estas hormonas, lo cual sería un mecanismo compensatorio que ayuda a estos fascículos no retrasen su transición de fenotipos de fibras.

8.2.3. Histoquímica para NADH-TR

En cuanto al metabolismo, tanto White *et al.* (2000), como Ruíz Rosado *et al.* (2013) concuerdan que la desnutrición provoca un aumento en el porcentaje de fibras con metabolismo oxidativo; sin embargo, esto sólo sucede en el fascículo F3. Lo cual, parece también involucrar a las hormonas tiroideas, pero con el receptor mitocondrial p43. Casas *et al.* (2008) demostraron que la sobreexpresión del receptor p43 a T3 en mitocondrias provoca un aumento en el metabolismo oxidativo, regulando a PGC-1 α y PPAR δ (los principales reguladores del fenotipo muscular); así como un aumento en isoformas de MHC lentas y estimula la biogénesis de mitocondrias; sin embargo, a largo plazo provoca atrofia muscular (Casas *et al.*, 2009).

En cambio, la eliminación de este receptor provoca que el fenotipo se vuelva más glucolítico y que se disminuya la densidad de capilares (Passemesse *et al.* 2012) y que ocurra un aumento en la sensibilidad a la insulina, así como un incremento significativo de los niveles de hormonas tiroideas y en la fosforilación de Akt (proteína quinasa que induce el transporte de glucosa al interior de las células) (Blanchet *et al.*, 2012), enzima que está relacionada con el aumento del metabolismo glucolítico (Kandel y Hay, 1999). Lo cual parece indicar que en los fascículos F2, F4 y F5 podría darse algo similar a esto, con una disminución de los receptores p43. Por lo cual, sería adecuado hacer un estudio donde se analice el efecto de la desnutrición crónica sobre los receptores p43 en el músculo, especialmente en los fascículos, pues podrían ser modificados, al igual que el fenotipo de las fibras, de manera diferencial, con sus respectivas consecuencias para los tipos de

fibras. Asimismo, el aumento el porcentaje de fibras rápidas, al menos en los fascículos F2 y F4, puede funcionar como una adaptación a los cambios producidos por el posible decremento de receptores p43, pues las fibras rápidas requieren de menor capilaridad para recibir los nutrientes (Peter *et al.*, 1972).

El mantenimiento del metabolismo glucolítico, excepto en el fascículo F3, parece ser una adaptación a la menor cantidad de nutrientes, inclusive hasta cierto punto, se puede considerar como este aumenta, pues como se ha demostrado que a pesar de haber menos receptores a glucosa GLUT-4 (Thamotharan *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2013), quizá asociado con los bajos niveles de hormonas tiroideas, ocurre un aumento en los receptores GLUT-1, GLUT-3 Y GLUT-5 (Dean *et al.*, 1998; Agote *et al.*, 2001), así como un aumento en la translocación en GLUT-4 (Gavate *et al.*, 2005; Garcia-Souza *et al.*, 2008) debido a la desnutrición, además de que posiblemente pueda haber menor cantidad de receptores p43 (lo que también podría aumentar la translocación en GLUT-4, de manera indirecta, a través de Akt; Kohn *et al.*, 1996), el metabolismo glucolítico se ve favorecido.

Mientras que el cambio en la maquinaria metabólica, como en el caso del fascículo F3, donde se da una transición de fibras con un metabolismo glucolítico a un metabolismo oxidativo, es más drástico y más asociado con las enfermedades a largo plazo (Zierath y Hawley, 2004), quizá al hecho de que, como han demostrado da Silva *et al.* (2014), si bien se aumenta la translocación de ácidos grasos, éstos no son utilizados para generar energía y lo que es más importante, es que son transformados en productos tóxicos, los cuales podría alterar el mtDNA. Algunas de estas características son asociadas con el llamado fenotipo ahorrador, el cual permite la supervivencia de los individuos bajo condiciones ambientales, principalmente la nutrición, no muy favorables, pero que a largo plazo traer consecuencias negativas sobre la salud, como lo es la obesidad, diabetes y enfermedades metabólicas (Hales y Barker, 2001).

Todo esto parece indicar que los cambios observados en cada fascículo (tanto en el fenotipo, como en el metabolismo) pueden deberse a la susceptibilidad de las hormonas tiroideas, quizá debido a los niveles séricos, la cantidad o tipo de receptores (nucleares o mitocondriales) que presenta cada uno, además de los cambios en los fascículos por la desnutrición *per se*. Asimismo, este trabajo permite demostrar que el efecto que ejerce un determinado factor es variable no sólo entre los distintos músculos

(v. Schiaffino y Reggiani, 2011; Blaauw *et al.*, 2013), sino también dentro de un mismo músculo.

8.3. Organización fractal de las fibras de los fascículos del m. EDL

Arsos y Dimitriu (1995) demostraron que las fibras tipo II se encuentran organizadas de forma fractal ($D= 1.89$) tanto en ratas jóvenes (25 días de edad), como ratas adultas (1 año de edad), aunque el análisis sólo fue hecho con alrededor de 200 fibras de la parte medial del m. EDL y bajo condiciones normales. El presente trabajo con la diferenciación de las fibras tipo II, en intermedias (IIa) y rápidas (IIb) y el uso de todas de las fibras en cada fascículo y bajo una condición normal y la desnutrición crónica, permite observar que ambos tipos tienen una organización fractal, formando grupos de fibras interconectados entre sí, tanto en los animales control, como en los desnutridos.

Las fibras de lentas (tipo I) no pudieron ser analizadas debido a la poca cantidad que presentan los fascículos. A pesar de esto, el método de correlación integral fractal es una buena forma para analizar este tipo de datos, debido a la forma en que se va calculando, lo cual permite que se analicen imágenes que no sean necesariamente del mismo tamaño y esto no afecte el cálculo de la dimensión fractal, como si ha sido observado con el método de conteo de cajas (Buldyrev, 2012), además que el cálculo del *prefactor de forma a* y el parámetro *c* permite un mejor análisis, primeramente para saber si es posible tratarlas como fractales y también para hacer un mejor cálculo de la dimensión. Asimismo, el uso del método fractal, como lo menciona Frankhauser (1998) permite establecer la existencia de una organización, incluso cuando no es visible debido a fenómenos aleatorios que la ocultan, lo cual se halló en este trabajo, pues a simple vista no parece que las fibras tengan una organización determinada, sino que parecen estar distribuidas aleatoriamente dentro de los fascículos; sin embargo, con este método se puede ver que esto no es así.

La desnutrición crónica en la mayoría de los fascículos no provoca un cambio significativo en cuanto a su organización, pues todos los tipos de fibras se mantuvieron con valores mayores a 1 y menores a 2; sin embargo, hubo ciertas alteraciones, mayormente en las fibras rápidas del fascículo F3, donde se observó una reducción significativa en la dimensión fractal, lo cual puede estar asociado con la gran pérdida de fibras rápidas que pasaron a fibras intermedias. Dichos cambios provocaron que los

grupos de fibras estuvieran más dispersos o que se formaran de una menor cantidad de fibras; asimismo, esto provocó cambio en los patrones de distribución de las fibras.

El análisis hecho para las fibras oxidativas y glucolíticas muestra que ambos tipos de metabolismo se encuentran organizados de forma fractal formando grupos de fibras interconectados entre sí. Pero a diferencia de la organización de las fibras intermedias y rápidas, donde se daban alteraciones y tendencias de cambio en la dimensión fractal, las fibras oxidativas y glucolíticas no se ven afectada su organización, inclusive los valores son muy similares entre los dos grupos.

8.4. Patrones de distribución de las fibras de los fascículos del m. *EDL*

Conociendo que las fibras de los fascículos del m. *EDL* presentan organización fractal, lo cual es el primer paso de acuerdo con Frankhauser (1998), el siguiente paso era determinar los patrones de distribución que presentan, pues como fue demostrado por Burkholder *et al.* (1994), la longitud de las fibras, la longitud del músculo y la distribución de los tipos de fibras y otras características más son determinantes para la función del músculo.

Pullen (1977) realizó un trabajo sobre la distribución de las fibras en el m. *EDL*; sin embargo, éste sólo se basa en las densidades que presentan en los ejes profundo a superficial y medial a lateral, encontrando que las fibras lentas se hallan más hacia la parte medial y profunda, las fibras intermedias se encuentran de forma similar en el eje medial-lateral y ligeramente más hacia el profundo, mientras que las rápidas se ubican en la parte lateral y superficial; mientras que Wang y Kernell (2001) hicieron una regionalización de las fibras tipo I y tipo II en diversos músculos de las extremidades posteriores de conejos, ratas y ratones, encontrando que las fibras no se encuentran distribuidas de manera uniforme. Si bien, esto es una buena aproximación, no permite la identificación de patrones, pues como se demostró en este estudio las fibras se encuentran organizadas de forma fractal, por lo que es importante determinar la forma en que interactúan los grupos de fibras del mismo tipo y cómo es que se distribuyen con respecto a los otros tipos de fibras.

Igualmente, cada fascículo presenta un patrón de distribución característico, los cuales no son similares a los hallados en dicho estudio, pues como se ha mencionado, la parte medial del músculo no es representativa para los cuatro fascículos. El fascículo F3

es el más afectado por la desnutrición crónica, lo cual parece estar relacionado con el hecho de que fue en este fascículo en donde se dieron los mayores cambios en los porcentajes de las fibras rápidas, así como una menor dimensión fractal. En cambio en el fascículo F4 ocurre una disminución en la densidad de fibras por cuadrante, pues en los mapas de distribución se nota un patrón muy similar al del grupo control. Mientras que los fascículos F2 y F5 no se dan cambios en los patrones de distribución. A pesar de que el fascículo F5 tuvo cambios parecidos al fascículo F3, en cuanto a su composición, pero no así en la organización y en la distribución de las fibras parece indicar que la composición mayormente de fibras rápidas en el fascículo F5 le permitió no sufrir esos cambios tan drásticos.

En general los patrones de distribución para las fibras, clasificadas por su metabolismo, no ven afectados, sólo se dan cambios en la densidad de fibras por cuadrante, ya que se encuentran en menor cantidad en los fascículos del grupo desnutrido que en los del grupo control, excepto en el F3, en donde las fibras ya no se encuentran en tan poca densidad como en el grupo control. Lo que puede estar indicando que las fibras que modificaron su fenotipo por efecto de la desnutrición crónica no se distribuyeran de manera aleatoria, sino que mantuvieron su organización fractal, tanto por la actividad de la ATPasa miofibrilar, como por su metabolismo energético.

A pesar de que no existen cambios en los patrones de distribución de las fibras en la mayoría de los casos, la reducción en el área de la sección transversal observada en todos los tipos de fibras del m. *EDL* debido a la desnutrición crónica (Ruíz-Rosado *et al.*, 2013), así como del músculo completo (Pereyra-Venegas *et al.*, 2015) puede tener implicaciones sobre la función del músculo y más aún en aquellos fascículos donde sí ocurren cambios en los patrones de distribución de las fibras; puesto que es un el m. *EDL* es un músculo que participa de manera relevante en el movimiento de los dedos de la pata de la rata. Por lo que las alteraciones observadas en la proporción de los tipos de fibras provocadas por la alimentación crónica deficiente en cantidad podría afectar o provocar alteraciones en la función de tal músculo, tal y como ha sido propuesto por Toscano *et al.* (2008) y por Bellinger *et al.* (2006). Además, dichos cambios podrían estar relacionados también con cambios en conducta estereotipadas, tales como un aumento de la frecuencia de acicalamiento y en la caminata (*walk over*) (Whatson y Smart, 1978), así como en la actividad ansiolítica (Jaiswal *et al.*, 1996).

9. CONCLUSIÓN

La composición de tipos de fibras de acuerdo a su actividad de ATPasa en el tipo de fibra y metabolismo determinado por la actividad de la NADH-TR es característica para cada uno de los fascículos del músculo *extensor digitorum longus* (m. *EDL*) de la rata macho *Wistar* de 35 días de edad, presentando valores diferentes en cada fascículo de los tipos de fibras lentas, intermedias (oxidativas y glucolíticas) y rápidas, destacando el fascículo F5 al presentar mayor porcentaje de fibra rápidas, a diferencia del resto de los fascículos, donde se encuentran mayormente fibras intermedias.

La desnutrición crónica ejerció un efecto diferencial sobre la composición, ya que mientras en los fascículos F3 y F5 se da una transición hacia fibras intermedias, en los fascículos F2 y F4 ocurre la transición hacia fibras rápidas. Así como un cambio hacia fibras con metabolismo oxidativo en el fascículo F3 y hacia fibras glucolíticas en el resto de los fascículos

El análisis fractal demostró que las fibras, tanto por su actividad de ATPasa miofibrilar, como por su metabolismo se encuentran organizadas de manera fractal. Asimismo, el cambio en la composición de fibras en los fascículos debido a la desnutrición crónica provocó que la organización fractal se viese reducida en las fibras rápidas del fascículo F3.

Las funciones de distribución permitieron determinar que los distintos fenotipos de las fibras y el metabolismo se encuentran formando patrones particulares para cada uno de los fascículos y que los cambios en la composición y organización provocados por la desnutrición crónica repercutieron en los patrones de distribución de las fibras en el fascículo F3.

Tanto el método fractal, como el método de funciones de distribución demuestran que: 1) las fibras en los fascículos del m. *EDL* presentan una organización y distribución determinada, es decir, no aleatoria, lo cual tiene implicación sobre el funcionamiento de cada uno de los fascículos, así como del músculo completo; y 2) el cambio del fenotipo de los distintos tipos de fibras provocados por la desnutrición crónica tiene como consecuencia cambios sobre en la organización y distribución de las fibras, lo que podría traer repercusiones en la función anatómica.

Finalmente, estos cambios sobre la composición, organización y distribución permiten establecer que la composición original del fascículo influye sobre la respuesta que tendrá frente a un factor; a su vez, esto implica que los análisis realizados sobre el m. *EDL* deben considerar hacerlo en cada uno de los fascículos.

LITERATURA CITADA

- Adam, R. L., R. C. Silva, F. G. Pereira, N. J. Leite, I. Lorand-Metze y K. Metze. 2006. The fractal dimension of nuclear chromatin as a prognostic factor in acute precursor B lymphoblastic leukemia. *Cellular Oncology* 28: 55-29.
- Adams, G., V. Caiozzo y K. Baldwin. 2003. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *Journal of Applied Physiology* 95: 2185-2201.
- Agbulut, O., P. Noirez, F. Beaumont y G. Butler-Brown. 2003. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biology of the Cell* 95: 299-406.
- Agote, M., L. Goya, S. Ramos, C. Alarez, M. L. Gavete, A. M. Pascual-Leone y F. Escrivá. 2001. Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 281: E1101-E1109.
- Alves, A. P., A. R. Dâmaso y V. Dai. 2008. Effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. *Jornal de Pediatria* 84(3): 264-271.
- Annadhasan, A. 2012. Methods of fractal dimension computation. *International Journal of Computer Science and Information Technology & Security* 2(1): 166-169.
- Arsos, G. A. y P. P. Dimitriu. 1995. A fractal characterization of type II fiber distribution in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. *Muscle & Nerve* 18: 961-968.
- Ausoni, S. L. Gorza, S. Schiaffino, K. Gundersen y T. Lomo. 1990. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscle. *The Journal of Neuroscience* 10: 153-160.
- Ayala-Moreno, R., R. Racotta, B. Anguiano, C. Aceves y L. Quevedo. 2013. Perinatal undernutrition programmes thyroid function in the adult rat offspring. *British Journal of Nutrition* 110: 2207-2215.
- Bagley, J. R., K. A. Murach y S. W. Trappe. 2012. Microgravity-induced fiber type shift in human skeletal muscle. *Gravitational and Space Biology* 26: 34-40.

- Baird, E. 2011. *Alt. Fractals: a visual guide to fractal geometry and design*. Chocolate Tree Books. Reino Unido. 232 p.
- Balice-Gordon, R. J. y W. J. Thompson. 1988. The organization and development of compartmentalized innervation in rat extensor digitorum longus muscle. *Journal of Physiology* 398: 211-231.
- Bárány, M. 1967. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *Journal of General Physiology* 50(6): 197-218.
- Bellinger, L., D. V. Sculley y S. C. Langley-Evans. 2006. Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. *International Journal of Obesity* 30: 729-738.
- Bianchi, S. y C. Martinoli. 2007. Leg. En: Bianchi, S. y C. Martinoli (Eds.). *Ultrasound of the musculoskeletal system*. Springer. Berlín, Alemania. Pp. 745-772.
- Bisoi, A. K. y J. Mishra. 2001. On calculation of fractal dimension of images. *Pattern Recognition Letter* 22: 631-637.
- Blaauw, B., S. Schiaffino y C. Reggiani. 2013. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Comprehensive Physiology* 3: 1645-1687.
- Blanchet, E., C. Bertrand, J. S. Annicotte, A. Schlernitzauer, L. Passemesse, J. Levin, G. Fouret, C. Feillet-Coudray, B. Bonafos, L. Fajas, G. Cabello, C. Wrutniak-Cabello y F. Casas. 2012. Mitochondrial T3 receptor p43 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. *The FASEB Journal* 26: 40-50.
- Bloemberg, D. y J. Quadrilatero. 2012. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS One* 7(4): e35273.
- Borina, E., M. A. Pellegrino, G. D'Antona y R. Bottinelli. 2010. Myosin and actin content of human skeletal muscle fibers following 35 days bed rest. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 20: 65-73.
- Bourges-Rodríguez, H. 2008. Los alimentos, la dieta y la alimentación. En: Casanueva, E., M. Kaufer-Horwitz, A. B. Pérez-Lizaur y P. Arroyo (Eds.). *Nutriología médica*. Editorial Médica Panamericana. México. Pp. 597-662.

- Brown, J. H., V. K. Gupta, B. Li, B. T. Milne, C. Restrepo y G. B. West. 2002. The fractal nature of nature: power laws, ecological complexity and biodiversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 357: 619-626.
- Buhmann, M. D. 2004. *Radial basis functions: theory and implementations*. Cambridge University Press. Reino Unido. 258 p.
- Buldyrev, S. V. 2012. Fractals in biology. En: Meyers, R. A. (Ed.). *Mathematics of complexity and dynamical systems*. Springer. E. U. A. Pp. 488-511.
- Buller, A. J., J. C. Eccles y R. M. Eccles. 1960. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *The Journal of Physiology* 150: 417-439.
- Burkholder, T. J., B. Fingado, S. Baron y R. L. Lieber. 1994. Relationship between muscle fiber type and sizes and muscle architectural properties in the mouse hindlimb. *Journal of Morphology* 221: 177-190.
- Casas, F., L. Passemesse, S. Grandemange, P. Seyer, N. Gueguen, O. Baris, L. Lepurry, G. Cabello y C. Wrutniak-Cabello. 2008. Overexpression of the mitochondrial T3 receptor induces a shift in skeletal muscle fiber types. *PLoS ONE* 3(6): e2501.
- Casas, F., L. Passemesse, S. Grandemange, P. Seyer, O. Baris, N. Gueguen, C. Ramonaxo, F. Perrin, G. Fouret, L. Lepourry, G. Cabello y C. Wrutniak-Cabello. 2009. Overexpression of the mitochondrial T3 receptor induces skeletal muscle atrophy during aging. *PLoS ONE* 4(5): e5631. doi:10.1371/journal.pone.0005631.
- Chávez-Fragoso, G. A., O. López-Ortega, E. E. Rodríguez-Torres, K. López-García e I. Jiménez-Estrada. 2015. Software para la clasificación de fibras musculares en imágenes histológicas. En: LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas (6-10 de septiembre, San Miguel de Allende, Guanajuato). *Memorias de Congreso*. Pp. 226.
- Close, R. 1967. Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rat. *Journal of Physiology* 193: 45-55.

- d'Albies, A., M. Lenfant-Guyot, C. Janmot, C. Chanoine, J. Weinman y C. L. Gallien. 1987. Regulation by thyroid hormones of terminal differentiation in skeletal dorsal muscle. I. Neonate mouse. *Developmental Biology* 132(1): 25-32.
- da Silva, R., O. Guzmán-Quevedo, G. Pérez-García, A. E. Toscano, C. Gois, R. Manhães-de-Castro y F. Bolaños-Jiménez. 2014. Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. *Acta Physiologica* 210: 70-83.
- Dauncey, M. J., P. White, K. A. Burton y M. Katsumata. 2001. Nutrition-hormone receptor-gene interactions: implication for development and disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 60: 63-72.
- Dean, D. J., J. T. Brozinick Jr., S. W. Cushman y G. D. Cartee. 1998. Calorie restriction increases cell Surface GLUT-4 in insulin-stimulated skeletal muscle. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 275: E957-E964
- Dubois, J. D. y J. H. Dussault. 1976. Ontogenesis of thyroid function in the neonatal rat. Thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3) production rates. *Endocrinology* 101(2): 435-441.
- Emery, P. W. 2005. Metabolic changes in malnutrition. *Eye* 19: 1029-1034.
- Falconer, K. 2003. *Fractal geometry: mathematical foundations and applications*. John Wiley & Sons Inc. Gran Bretaña. 366 p.
- Falconer, K. 2013. *Fractals: a very short introduction*. Oxford University Press. Reino Unido. 132 p.
- FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2015. Mapa del hambre 2015 de la FAO. Disponible en: <<http://www.fao.org/hunger/es/>> (fecha de consulta: 9 de diciembre de 2015).
- Frankhauser, P. 1998. The fractal approach. A new tool for spatial analysis of urban agglomerations. *Population, an English Selection* 10(1): 205-240.
- García, V., E. E. Rodríguez-Torres, B. A. Itzá-Ortiz, J. Viveros-Rogel, K. López-García e I. Jiménez-Estrada. En: LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de

Ciencias Fisiológicas (6-10 de septiembre, San Miguel de Allende, Guanajuato).
Memorias de Congreso. Pp. 291.

Garcia-Souza, É. P., S. V., G. Barreto, A. Lages, M. Sampaio, A. Sanchez y C. Barja-Fidalgo. 2008. Maternal protein restriction during lactation induces GLUT4 translocation and mTOR/Akt activation in adipocytes of adult rats. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 295: E626-E636.

Gavate, M. L., M. A. Martín, C. Alvarez y F. Escrivá. 2005. Maternal food restriction enhances insulin-induced GLUT-4 translocation and insulin signaling pathway in skeletal muscle from suckling rats. *Endocrinology* 146(8): 3368-3378.

Green, D. M. 1991. Chaos, fractals and nonlinear dynamics in evolution and phylogeny. *Trends in Ecology & Evolution* 6(10): 333-337.

Guerrant, R. L., M. D. DeBoer, S. R. Moore, R. J. Scharf y A. A. M. Lima. 2013. The impoverished gut – a triple burden of diarrhea, stunting and chronic disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 10: 220-229.

Guth, L. y F. Samaha. 1970. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Experimental Neurology* 28: 365-367.

Gutmann, E. y J. Zelena. 1962. Morphological changes in the denervated muscle. En: Gutmann, E. *The denervated muscle*. Springer, E. U. A. Pp. 57-102.

Hales, C. N. y D. J. Barker. 2001. The thrifty phenotype hypothesis: type 2 diabetes. *British Medical Bulletin* 60(1): 5-20.

Harlow, H. T., T. Lohuis, T. D. Beck y P. A. Iaizzo. 2001. Muscle strength in over-wintering bears. *Nature* 409: 997.

Hill, J. A. y E. N. Olson. 2012. An introduction to muscle. Pp. 3-11. En: Hill, J. A. y E. N. Olson. *Muscle: fundamental biology and mechanism of disease*. Academic Press. E. U. A.

Hill, R. W., G. A. Wyse y M. Anderson. 2012. *Animal physiology*. Sinauer Associates. Estados Unidos de América. 985 p.

- Hoppeler, H., M. Vogt, E. R. Weibel y M. Flück. 2003. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Experimental Physiology* 88: 109-119.
- Hou, L., A. H. Kongsted, S. M. Ghoreishi, T. K. Takhtsabzy, M. Friedrichsen, L. I. Hellgren, H. N. Kadarmideen, A. Vaag y M. O. Nielsen. 2013. Pre- and early-postnatal nutrition modify gene and protein expressions of muscle energy metabolism markers and phospholipid fatty acid composition in a muscle type specific manner in sheep. *PLoS ONE* 8(6): e65452. doi:10.1371/journal.pone.0065452.
- Howells, K. F., D. R. Mathews y T. C. Jordan. 1978. Effects of pre and perinatal malnutrition on muscle fibers from fast and slow rat muscles. *Research in Experimental Medicine* 173: 35-40.
- Iversen, P. O. y G. Nicolaysen. 1995. Fractals describe blood flow heterogeneity within skeletal muscle and within myocardium. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 268(1): H112-H116.
- Izumo, S., B. Nadal-Ginard y V. Mahdavi. 1986. All members of the MHC multigenic family respond to thyroid hormones in a highly tissue-specific manner. *Science* 23: 597-600.
- Jaiswal, A. K., S. N. Upadhyay, K. S. Satyan y S. K. 1996. Bhattacharya. Behavioural effects of prenatal and postnatal undernutrition in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*: 34(12): 1216-1219.
- Jamali, A. A., P. Afshar, R. A. Abrams y R. L. Lieber. 2000. Skeletal muscle response to tenotomy. *Muscle & Nerve* 23: 851-862.
- Johnsen, L., A. H. Kongsted y M. O. Nielsen. 2013. Prenatal undernutrition and postnatal overnutrition alter thyroid hormone axis function in sheep. *Journal of Endocrinology* 216: 389-402.
- Kalliokoski, K. K., T. A. Kuusela, P. Nuutila, T. Tolvanen, V. Oikonen, M. Teräs, T. E. Takala y J. Knuuti. 2001. Perfusion heterogeneity in human skeletal muscle: fractal analysis of PET data. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 28(4): 450-456.

- Kalliokoski, K. K., T. A. Kuusela, M. S. Laaksonen, J. Knuuti y P. Nuutila. 2003. Muscle fractal vascular branching patterns and microvascular perfusion heterogeneity in endurance-trained and untrained men. *Journal of Physiology* 546: 529-535.
- Kandel, E. S. y N. Hay. 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental Cell Research* 253: 210-229.
- Kelly, A. M. y N. A. Rubinstein. 1980. Why are fetal muscles slow? *Nature* 288: 266-269.
- Kijowski, J. 2001. Muscle proteins. En: Sikorski, Z. E. (Ed.). *Chemical and functional properties of food*. CRC Press. E. U. A. Pp. 233-270.
- Kim, J. Y. 2012. Hindlimb muscle atrophy occurs from short-term undernutrition in rats. *Biological Research for Nursing* 15(4): 459-464.
- Kitaoka, H., R. Takaki y B. Suki. 1999. A three-dimensional model of the human airway tree. *Journal of Applied Physiology* 87(6): 2207-2217.
- Klinkenber, B. 1994. A review of methods used to determine the fractal dimension of linear features. *Mathematical Geology* 26(1): 23-46.
- Kohn, A. D., S. A. Summers, M. J. Birnbaum y R. A. Roth. 1996. Expression of a constitutively active Akt ser/thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 31372-31378.
- Lannotti, J. P. y R. D. Parker. 2013. *Musculoskeletal system, part II: spine and lower limb*. Saunders, Elsevier. Filadelfia, Pensilvania, E. U. A. 272 p.
- Lefaucheur, L., P. Ecolan, Y.-M. Barzic, J. Marion y J. Le Dividich. 2003. Early postnatal food intake alters myofiber maturation in pig skeletal muscle. *The Journal of Nutrition* 133(1): 140-147.
- Lehnert, S. A., K. A. Byrne, A. Reverter, G. S. Nattrass, P. L. Greenwood, Y. H. Wang, N. J. Hudson y G. S. Harper. 2006. Gene expression profiling of bovine skeletal muscle in response to and during recovery from chronic and severe undernutrition. *Journal of Animal Science* 84: 3239-3250.

- Lehnert, M., H. Laurer, B. Maier, J. Frank, I. Marzi, W.-I. Steudel y A. Mautes. 2007. The histochemical profile of the rat *extensor digitorum longus* muscle differentiates after birth and dedifferentiates in senescence. *European Journal of Histochemistry* 51(2): 111-118.
- Lodish, H., A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Brets, H. Ploegh, A. Amon y M. S. Scott. 2012. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman. E. U. A. 973 p.
- Losa, G. A. 2012. Fractals and their contribution to biology and medicine. *MEDICOGRAPHIA* 34(3): 365-374.
- Lucas, A. 1998. Programming by early nutrition: and experimental approach. *The Journal of Nutrition* 128: 401S-406S.
- Luden, N., E. Hayes, K. Michev, E. Louis, U. Raue, T. Conley y S. Trappe. 2012. Skeletal muscle plasticity with marathon training in novice runner. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 22: 662-670.
- Luther, P. K. 2009. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signaling. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 30: 171-185.
- MacIntosh, B. R., P. F. Garnider y A. J. McComas. 2006. *Skeletal muscle: form and function*. Human Kinetics. E. U. A. 423 p.
- Mahdavi, V., S. Izumo y B. Nadal-Ginard. 1987. Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Circulation Research* 60: 804-814.
- Martin, T., R. Stein, P. Hoepfner y D. Reid. 1992. Influence of electrical stimulation on the morphological and metabolic properties of paralyzed muscle. *Journal of Applied Physiology* 72: 1401-1406.
- Martinez, O., R. de Oliveira, M. Falvo y M. de Castro. 2008. Fractal dimension applied to plant identification. *Information Sciences* 178(12): 2722-2733.
- Matsakas, A. y K. Patel. 2009. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histology and Histopathology* 24: 611-629.
- McAtee, R. E. y J Charland. 2007. *Facilitated stretching*. Human Kinetics. Champaign, Illinois, E. U. A. 183 p.

- Midrio, M., D. D. Betto, R. Betto, D. Noventa y F. Antico. 1988. Cordotomy-denervation interactions on contractile and myofibrillar properties of fast and slow muscles in the rat. *Experimental Neurology* 100: 216-236.
- Mitzunoya, W., S. Sawano, Y. Iwamoto, Y. Sato, R. Tatsumi y Y. Ikeuchi. 2013. Effect of 48-h food deprivation on the expression of myosin heavy-chain isoforms and fiber type-related factors in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 59: 289-298.
- Morse, D. R., J. H. Lawton, M. M. Dodson y M. H. Williamson. 1985. Fractal dimension of vegetation and the distribution of arthropod body lengths. *Nature* 314: 731-733.
- Nachlas, M. M., K. C. Tsou, E. de Souza, S. C. Cheng y A. M. Seligman. 1957. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 5:420-436.
- Nachlas, M. M., D. G. Walker y A. M. Seligman. 1958. A histochemical method for the demonstration of DNP-diaphorase. *The Journal of Cell Biology* 4: 29-38.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2015. Infant and young child feeding. Fact sheet No. 342. Consultado en: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs342/en/>>, (fecha de consulta 15 de agosto de 2015).
- Orr, M. J. L. 1996. Introduction to radial basis function networks. Disponible en: [http://twyu2.synology.me/htdocs/class_2008_1/nn/Slides/Introduction%20to%20Radial%20Basis%20Function%20Networks%20\(1996\).pdf](http://twyu2.synology.me/htdocs/class_2008_1/nn/Slides/Introduction%20to%20Radial%20Basis%20Function%20Networks%20(1996).pdf).
- Ozaki, G., R. C. T. Camargo, T. E. Koike, T. A. Garcia, R. C. Castoldi y J. C. S. Camargo. 2015. Fractal analysis of skeletal muscle tissue of rat subjected to stretch injury. *International Journal of Morphology* 33(3): 908-913.
- Paniagua, R. 2007. *Citología e histología vegetal y animal*. McGraw-Hill. España. 1056 p.
- Parada-Simão, T. R, F. Oliveira, M. E. Pacheco, P. H. M. Alves y E. A. Liberati. 2011. Effects of protein malnutrition on muscle fibers of the brachial biceps and medial pterygoid of Wistar rats. *Journal of Morphological Science* 28(3): 196-203.

- Passemesse, L., A. Schlernitzauer, C. Sar, J. Levin, S. Grandemange, P. Seyer, F. B. Favier, S. Kaminski, G. Cabello, C. Wrutniak-Cabello y F. Casas. 2012. Depletion of the p43 mitochondrial T3 receptor in mice affects skeletal muscle development and activity. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26: 748-756.
- Patton, K. T. y G. A. Thibodeau. 2015. *Anatomy and physiology*. Elsevier. E. U. A. 1264 p.
- Pereyra-Venegas, J., B. Segura-Alegría, J. C. Guadarrama-Olmos, S. Mariscal-Tovar, S. Quiróz-González e I. Jiménez-Estrada. 2015. Effects provoked by chronic undernourishment on the fibre type composition and contractility of fast muscle in male and female developing rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99(5): 974-986.
- Peter, J. B., R. J. Barnard, V. R. Edgerton, C. A. Gilliespie y K. E. Stempel. 1972. Metabolic profiles of the three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11(14): 2672-2633.
- Pette, D. y R. S. Staron. 1997. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *International Review of Cytology* 170: 143-223.
- Pette, D, H. Peuker y R. S. Staron. 1999. The impact of biochemical methods for single muscle fiber analysis. *Acta Physiologica Scandinavica* 166: 261-277.
- Pette, D. y R. S. Staron. 2001. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochemistry and Cell Biology* 115: 359-372.
- Pilla, R. 2012. *A neuron-specific protein found in skeletal muscle: new frontiers for GAP-43*. Universal-Publishers. 92 p.
- Polla, B., V. Cappelli, F. Morello, M. Pellegrino, F. Boschi, O. Pastoris y C. Reggiani. 2001. Effects of the beta(2)-agonist clenbuterol on respiratory and limb muscle weaning rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280: R862-R869.
- Pullen, A. H. 1977. The distribution and relative sizes of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. *Journal of Anatomy* 123 (2): 467-486.

- Quintin, S., C. Gally y M. Labouesse. 2008. Epithelial morphogenesis in embryos: asymmetries, motors and brakes. *Trends in Genetics* 24(5): 221-230.
- Ramírez-Oseguera, R. T., A. M. Jiménez-Garduño, R. Álvarez, K. Heine, E. Pinzón-Estrada, I. Torres-Saldaña y A. Ortega. 2013. Gestational undernourishment modifies the composition of skeletal muscle transverse tubule membranes and the mechanical properties of muscle in newborn rats. *Cellular Physiology and Biochemistry* 32(4): 1024-1039.
- Röckl, K. S. C., M. F. Hirshman, J. Brandauer, N. Fujii, L. A. Witters y L. J. Goodyear. 2007. Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-activated protein kinase mediate muscle fiber type shift. *Diabetes* 56: 2062-2069.
- Rossi, A. C., C. Mammucari, C. Argentini, C. Reggiani y S. Schiaffino. 2010. Two novel/ancient myosins in mammalian skeletal muscles: MYH14/7b and MYH15 are expressed in extraocular muscle and muscle spindles. *The Journal of Physiology* 558(2): 353-364.
- Roure, C. 2010. Estrategias nutricionales en médicos sin fronteras-España. En: Soriano, J. M. (Ed.). *Nutrición y cooperación al desarrollo*. Universitat de València. España. Pp. 73-86.
- Ruíz-Rosado, A., F. Fernández-Valverde, S. Mariscal-Tovar, C. X. Hinojosa-Rodríguez, J. A. Hernández-Valencia, Á. Anzueto-Ríos, J. C. Guadarrama-Olmos, B. Segura-Alegría e I. Jiménez-Estrada. 2013. Histoenzymatic and morphometric analysis of muscle fibre type transformation during the postnatal development of chronically food-deprived rat. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 61: 372-381.
- Satterfield, M. C., J. R. McKnight, X. Li y G. Wu. 2011. Nutrition, epigenetics, and vascular function. En: Maulik, N. y G. Maulik (Eds.). *Nutrition, epigenetic mechanisms, and human disease*. CRC Press. E. U. A. Pp. 125-140.
- Saunders, J., T. Smith y M. Stroud. 2014. Malnutrition and undernutrition. *Medicine* 43(2): 112-118.
- Savino, W. 2002. The thymus gland is a target in malnutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 53 (Sup. 3): S46-S49.

- Schiaffino, S. y C. Reggiani. 1994. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 72 (2): 493-501.
- Schiaffino, S. y C. Reggiani. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews* 91: 1447-1531.
- Segura, B., J. C. Guadarrama, A. L. Gutiérrez, H. Merchant, L. Cintra e I. Jiménez-Estrada. 2001. Effect of perinatal food deficiencies on the compound action potential evoked in sensory nerves of developing rats. *Nutritional Neurosciences* 4(6): 475-488.
- Seligman, A. M., M. J. Karnovsky, H. L. Wasser-kraug y J. S. Hanker. 1968. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *The Journal of Cell Biology* 38:1-14.
- Sellers, J. R. 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta* 1496: 3-22.
- Sherwood, L. 2014. *Human physiology: from cells to systems*. Cengage Learning. E. U. A. 912 p.
- Shetty, P. 2003. Malnutrition and undernutrition. *Medicine* 31(4): 18-22.
- Swoap, S. J., F. Haddad, P. Bodell, K. M. Baldwin. 1994. Effect of chronic energy deprivation on cardiac thyroid receptor and myosin isoform expression. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 266(2): E254-E260.
- Talanquer, V. 2011. *Fractus, fracta, fractal: fractales, de laberintos y espejos*. Fondo de Cultura Económica. México. 108 p.
- Tang, Y. Y. 2012. *Document analysis and recognition with wavelet and fractal theories*. World Scientific Publishing Co, Pte. Ltd. Singapur. 372 p.
- Tasić, D., D. Dimov, J. Gligorijević, L. Veličković, K. Katić, M. Krstić e I. Dimov. 2003. Muscle fibre types and fibre morphometry in the tibialis posterior and anterior of the rat: a comparative study. *Facta Universitatis – Medicine and Biology* 10(1): 16-21.

- Termin, A., R S. Staron y D. Pette. 1989. Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of a rat fast hindlimb muscle. A single-fiber study. *European Journal of Biochemistry* 186(3): 749-754.
- Thamotharan, M., B.-C. Shin, D. T. Suddirikku, S. Thamotharan, M. Garg y S. U. Devaskar. 2004. GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 288: E935-E947.
- Thomas, I., P. Frankhauser y D. Badariotti. 2012. Comparing the fractality of European urban neighbourhoods: do national context matter?. *Journal of Geographical Systems* 14:189-208.
- Tiidus, P. M. 2011. Influence of estrogen on muscle plasticity. *Brazilian Journal of Biomotricity* 5: 143-155.
- Toscano, A. E., R. Manhães-de-Castro y F. Canon. 2008. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition* 24: 270-278.
- Travell, J. G. y D. G. Simons. 1993. *Myofascial pain and dysfunction, the trigger point manual: the lower extremities*. Lippincott Williams & Wilkins. Maryland, Pensilvania, E. U. A. 626 p.
- UNICEF (Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia). 2006. *Progreso para la infancia: un balance sobre la nutrición*. UNICEF. Nueva York. E. U. A. 33 p.
- UNICEF (Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia). 2015. *Types of undernutrition: growth failure*. Disponible en: <<http://www.unicef.org/nutrition/training/2.3/1.html>> (fecha de consulta: 9 de diciembre de 2015).
- Verma, M. 2011. Nutritional epigenetics and disease prevention: are we there yet? En: Maulik, N. y G. Maulik (Eds.). *Nutrition, epigenetic mechanisms, and human disease*. CRC Press. E. U. A. Pp. 1-12.
- Viveros-Rogel, J., E. E. Rodríguez-Torres, K. López-García e I. Jiménez-Estrada. En proceso. *A method for the reconstruction of histochemical images in and a metric for their comparison between different experimental conditions*.

- Wang, C. 2012. Evaluation of a least-squares radial basis function approximation method for solving the Black-Scholes equation for option pricing. Tesis de maestría. Uppsala Universitet. Suecia. 35 p.
- Wang, L. C. 2001. Fibre type regionalisation in lower hindlimb muscles of rabbit, rat and mouse: a comparative study. *Journal of Anatomy* 199(6): 631-643.
- Ward, S. S. y N. C. Stickland. 1991. Why are slow and fast muscle differentially affected during prenatal undernutrition? *Muscle and Nerve* 14(3): 259-267.
- Welsch, U. 2008. *Histología*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 676 p.
- Watson, T. S. y J. L. Smart. 1978. Social behavior of rats following pre- and early postnatal undernutrition. *Physiology & Behavior* 20(6): 749-753.
- Whitaker, R. H. y N. R. Borley. 2010. *Instant anatomy*. Wiley-Blackwell. E. U. A. 256 p.
- White, P. y M. J. Dauncey. 1999. Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *Journal of Molecular Endocrinology* 23: 241-254.
- White, P., D. Cattaneo y M. J. Dauncey. 2000. Postnatal regulation of myosin heavy chain isoform expression and metabolic enzyme activity by nutrition. *British Journal of Nutrition* 84: 185-194.
- White, P., K. A. Burton, A. L. Fowden y M. Dauncey. 2001. Developmental expression analysis of thyroid hormone receptor isoforms reveals new insights into their essential function in cardiac and skeletal muscles. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(8): 1367-1376.
- Wilson, S. J., J. J. Ross y A. J. Harris. 1988. A critical period for formation of secondary myotubes defined by prenatal undernourishment in rats. *Development* 102: 815-821.
- Wisbaum, S. 2011. *La desnutrición infantil: causas, consecuencias y estrategias para su prevención y tratamiento*. UNICEF. España. 32 p.

- Woo, M., E. Isganaitis, M. Cerletti, C. Fitzpatrick, A. J. Wagers, J. Jimenez-Chillaron y M. E. Patti. 2011. Early life nutrition modulates muscle stem cell number: implication for muscle mass and repair. *Stem Cells and Development* 20(10): 1763-1769.
- Wu, G., F. W. Bazer, T. A. Cudd, C. J. Meininger y T. E. Spencer. 2004. Maternal nutrition and fetal development. *The Journal of Nutrition* 134: 2169-2172.
- Yamaguchi, A., Y. Horio, K. Sakuma y S. Katsuta. 1993. The effect of nutrition on size and proportion of muscle fiber types during growth. *Journal of Anatomy* 182: 29-36.
- Yu, F., S. Göethe, L. Winkström, D. Forrest, B. Vennström y L. Larsson. 2000. Effects of thyroid hormone receptor gene disruption on myosin isoform expression in mouse skeletal muscles. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 278: R1545-R1554.
- Zhang, D., X. Wang, Y. Li, L. Zhao, M. Lu, X. Yao, H. Xia, Y. Wang, M-F. Liu, J. Jiang, X. Li y H. Ying. 2014. Thyroid hormone regulates muscle fiber type conversion via miR-133a1. *The Journal of Cell Biology* 207(6): 753-766.
- Zhu, M. J., S. P. Ford, W. J. Means, B. W. Hess, P. W. Nathanielsz y M. Du. 2006. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. *Journal of Physiology* 575: 241-250.
- Zierath, J. R. y J. A. Hawley. 2004. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biology* 2(10): 1523-1527.

GLOSARIO

Acetilación: Adición de un grupo acetilo (-COCH₃) a una molécula.

ATPasa miofibrilar (mATPasa): Molécula de miosina que hidroliza al ATP durante la generación de fuerza.

Atrofia: disminución del tamaño de un tejido.

Centroide: es la posición media dentro de un espacio.

Distrofia: aumento en el tamaño de un tejido.

DNA (Ácido desoxirribonucleico): Molécula que contiene la información genética de un organismo.

Epigenética: Cambios en la expresión génica sin modificación en la secuencias de los genes.

Fascículo: Conjunto de fibras de músculo esquelético rodeadas por perimysio.

FOXO1 (Forkhead box O1): Factor de transcripción regulador de la homeostasis de la glucosa, ciclo celular y apoptosis.

Fractal: Objeto cuya estructura se repite a diferentes escalas.

Metabolismo glucolítico: Conjunto de reacciones bioquímicas para la transformación de azúcares en energía (ATP).

Metabolismo oxidativo: Conjunto de reacciones bioquímicas para la transformación de ácidos grasos en energía (ATP).

Metilación: Adición de un grupo metilo (-CH₃) a una molécula.

miRNA (=micro RNA): Moléculas de RNA que modulan la expresión génica.

Músculo penniforme: tipo de arreglo de las fibras musculares, donde éstas se encuentran diagonalmente respecto al tendón central.

NADH-TR (Nicotinamida adenina dinucleótido-tetrazolio reductasa): enzima con propiedad de transferir hidrógeno de la forma reducida de NAD⁺ (NADH) al

tetrazolio. Se aplica para evaluar actividad de la enzima mitocondrial NADH deshidrogenasa.

Organización fractal: disposición no aleatoria que sigue las propiedades de la geometría fractal.

PCG1 α : Coactivador transcripcional para receptores de esteroides y nucleares; considerado un regulador clave en el metabolismo energético.

Programación fetal: modificación de la expresión génica debido al ambiente materno durante el desarrollo embrionario.

RNA (Ácido ribonucleico): Molécula con una variedad de actividades relacionadas con la expresión de genes; los principales tipos son el de transferencia (tRNA), mensajero (mRNA) y ribosomal (rRNA).

Sarcómera: Región delimitada entre dos líneas o discos Z, la cual se considera como la unidad funcional de la fibra muscular.

APÉNDICE 1

Script para crear imágenes binarias a partir de las coordenadas X, Y de los centroides

```
function [ ] = Generar_imagenes(archivo,tam)
%UNTITLED2 Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here
Nombre=archivo;
Datos=xlsread(archivo);
%%Datos
w=Datos(1,3);
h=Datos(2,3);
Datos=[Datos(:,1) Datos(:,2)];
%%Datos
%obtener width y height de la segunda columna del excel
figure
scatter(Datos(:,1),Datos(:,2),tam,'black','filled');
set(gca, 'YDir', 'reverse') %Revertir el eje Y

j=gcf;
set(j,'Units','pixels');
set(j,'Position',[0 50 400 400*h/w])
axis([0 w 0 h])
axis equal;
axis off;

set(j,'PaperPositionMode','auto')
set(gca,'pos',[0 0 1 1])
%%set(h,'Position',[0 0 750 750]);
print(j, strcat(strrep(Nombre, '.xls', ''), 'Reconstruida.tif'), '-r150', '-dtiff')
saveas(j, strcat(strrep(Nombre, '.xls', ''), 'Reconstruida.fig'), 'fig');

end
```

APÉNDICE 2

Método de funciones de base radial

Dada un colección de datos en el plano $D = \{X_j = (x_j, y_j) : j = 1, \dots, N\}$, ajustar una función de distribución espacial de los datos.

Los datos de localización de las fibras se delimitan dentro de un marco, el cual se divide en $N \times N$ celdas

N = número de celdas, es un parámetro subjetivo que afectará la construcción de la función de distribución.

Para cada celda se hace un conteo de puntos (N_{ij}) y se calcula el estimador insesgado de la matriz de covarianza de los datos de dicha celda:

$$\sum_{ij} = \frac{[X_1 - \bar{X}_{ij} \dots X_{N_{ij}} - \bar{X}_{ij}][X_1 - \bar{X}_{ij} \dots X_{N_{ij}} - \bar{X}_{ij}]^t}{N_{ij} - 1}$$

Donde:

\bar{X}_{ij} , es el centroide [$\bar{X}_{ij} = (\bar{x}_{ij}, \bar{y}_{ij})$] de los datos de la celda (i, j) .

$X_1 \dots X_{N_{ij}}$, es el dato k -ésimo [$X_k = (x_{ij}^k, y_{ij}^k)$] en la celda (i, j) .

t , es la matriz transpuesta.

Siguiente, se construye una función gaussiana (función de base radial) para la celda (i, j) de la siguiente manera:

$$\Phi_{ij}(X) = N_{ij} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (X - \bar{X}_{ij})^t \sum_{ij}^{-1} (X - \bar{X}_{ij}) \right\}$$

La función de distribución espacial de las fibras se obtiene superponiendo linealmente las funciones de densidad de cada celda:

$$\Phi(x, y) = \sum_{ij} N_{ij} \Phi_{ij}(x, y)$$

Casos especiales

1. Si la celda (i, j) está vacía, entonces $\Phi_{ij} = 0$ (función idénticamente cero).
2. Si la celda (i, j) tiene solamente un punto (x_p, y_p) entonces se calcula la distancia δ de ese punto al margen horizontal o vertical más cercano de la celda. Luego, se define la función de distribución para la celda (i, j) de la siguiente manera:

$$\Phi_{ij}(x, y) = \exp \left\{ \frac{1}{2} \left(\frac{(x - x_p)^2}{(\delta/3)^2} + \frac{(y - y_p)^2}{(\delta/3)^2} \right) \right\}$$

3. Si Σ_{ij} es singular o cercana a serlo (determinante $\leq 10^{-6}$) entonces Φ_{ij} se construye de la siguiente manera:

$$\lambda_{ij} := \max \{ \|X_k - \bar{X}_{ij}\|^2 \}, \lambda_2 := \lambda_1/9$$

Sean $u_1 := (X_k - \bar{X}_{ij}) / \|X_k - \bar{X}_{ij}\|$ (cualquier k)

$$u_2 := \begin{pmatrix} 0 & -1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix} u_1 \text{ (} u_1 \text{ y } u_2 \text{ son perpendiculares)}$$

Sean $M := [u_1 u_2]$ y $\Lambda := \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2)$ (matriz diagonal)

$$\text{Cov} := M \Lambda M^t$$

$$\text{Finalmente } \Phi_{ij}(X) := \exp \left\{ \frac{-1}{2} (X - \bar{X}_{ij})^t \text{Cov}^{-1} (X - \bar{X}_{ij}) \right\}$$

Los parámetros N , $\delta/3$ y $\lambda/9$ son subjetivos, es decir, están sujetos al criterio del investigador. La elección de estos parámetros afecta la forma de la distribución. Para este trabajo se ocuparon éstos pues fue con los que se logró el óptimo resultado.

APÉNDICE 3

Script en MatLab del método de funciones de base radial

❖ ATPasa

```
function [ h ] = CombinarFuncionesATP( Archivo1,
Archivo2,Archivo3,num,res, zoom)%%Hacer ATP
D1=xlsread(Archivo1);%Leer el Archivo 1 y guardarlo en una matriz de
n*2
D2=xlsread(Archivo2);
D3=xlsread(Archivo3);

if strcmp(zoom,'4x')
    fac=1.4;
else
    if strcmp(zoom,'10x')
        fac=3.18;
    else
        if strcmp(zoom,'default')
            fac=1;
        end
    end

end

end

D1=(1/fac)*[D1(:,1) D1(:,2)];
D2=(1/fac)*[D2(:,1) D2(:,2)];
D3=(1/fac)*[D3(:,1) D3(:,2)];

MinD1=min(D1);%%Vector de dos entradas con las coordenadas minimas x y
y del archivo d1
MaxD1=max(D1);%%Analogo
MinD2=min(D2);%%Vector de dos entradas con las coordenadas minimas x y
y del archivo d2
MaxD2=max(D2);
MinD3=min(D3);%%Vector de dos entradas con las coordenadas minimas x y
y del archivo d3
MaxD3=max(D3);

xmin=min([MinD1(1),MinD2(1),MinD3(1)]);
ymin=min([MinD1(2),MinD2(2),MinD3(2)]);
xmax=max([MaxD1(1),MaxD2(1),MaxD3(1)]);
ymax=max([MaxD1(2),MaxD2(2),MaxD3(2)]);

M1=Malla(Archivo1,num,res,true,true,[xmin,xmax,ymin,ymax],zoom);
M2=Malla(Archivo2,num,res,true,true,[xmin,xmax,ymin,ymax],zoom);
M3=Malla(Archivo3,num,res,true,true,[xmin,xmax,ymin,ymax],zoom);

X=M1.xx;
Y=M1.yy;
```

```

F1=M1.FuncionT;
F2=M2.FuncionT;
F3=M3.FuncionT;

F1c=M1.CentroidesMax;
F2c=M2.CentroidesMax;
F3c=M3.CentroidesMax;

FTCmax=max([M1.Cmax,M2.Cmax,M3.Cmax]);

FM1=((F1>F2).*F1)>F3).*F1;
FM2=((F2>F1).*F2)>F3).*F2;
FM3=((F3>F1).*F3)>F2).*F3;
figure
surf(X,Y,40*FM1,'FaceColor',[0 0 255]/255,'LineWidth',0.01);axis([xmin
xmax ymin ymax]);
hold on;
surf(X,Y,8*FM2,'FaceColor',[255 0 0]/255,'LineWidth',0.01);
surf(X,Y,FM3,'FaceColor',[0 255 0]/255,'LineWidth',0.01);

plot3(F1c(1),F1c(2),40*FTCmax,'Color','r','Marker','o','LineWidth',5,'
LineStyle','none');
plot3(F2c(1),F2c(2),40*FTCmax,'Color','g','Marker','o','LineWidth',5,'
LineStyle','none');
plot3(F3c(1),F3c(2),40*FTCmax,'Color','b','Marker','o','LineWidth',5,'
LineStyle','none');

set(gca,'YDir','reverse'); %Revertir el eje Y

xlabel('X Micras'),ylabel('Y Micras')

h =
legend(strrep(Archivo1,'.xls',''),strrep(Archivo2,'.xls',''),strrep(Ar
chivo3,'.xls',''),strcat('Centroides',' ',strrep(Archivo1,'.xls',''))
, strcat('Centroides',' ',strrep(Archivo2,'.xls',''))
, strcat('Centroides','
',strrep(Archivo3,'.xls','')),3,'Location','NorthEast');
set(h,'Interpreter','none');
set(h,'FontSize',6);

h=gcf;
title(strcat(strrep(Archivo1,'.xls',''),' ',strrep(Archivo2,'.xls','')
,'y',strrep(Archivo3,'.xls',''),sprintf('(%i X %i)',num,num),'3D'));
set(h,'Units','pixels');
set(h,'Position',[0 0 750 750]);

view(-45,76);
saveas(h,strcat(strrep(Archivo1,'.xls',''),' ',strrep(Archivo2,'.xls','
'),'y',strrep(Archivo3,'.xls',''),sprintf('(%i X
%i)',num,num),'3D','fig'),'fig');
print(strcat(strrep(Archivo1,'.xls',''),' ',strrep(Archivo2,'.xls','')
,'y',strrep(Archivo3,'.xls',''),sprintf('(%i X
%i)',num,num),'3D','png','-dpng','-r600');

```

```
end
```

❖ NADH-TR

```
function [ h ] = CombinarFuncionesNADH( Archivo1,
Archivo2,num,res,zoom)%%Hacer ATP
D1=xlsread(Archivo1);%Leer el Archivo 1 y guardarlo en una matriz de
n*2
D2=xlsread(Archivo2);

if strcmp(zoom,'4x')
    fac=1.4;
else
    if strcmp(zoom,'10x')
        fac=3.18;
    else
        if strcmp(zoom,'default')
            fac=1;
        end
    end

end

end

D1=(1/fac)*[D1(:,1) D1(:,2)];
D2=(1/fac)*[D2(:,1) D2(:,2)];

MinD1=min(D1);%%Vector de dos entradas con las coordenadas minimas x y
y del archivo d1
MaxD1=max(D1);%%Analogo
MinD2=min(D2);%%Vector de dos entradas con las coordenadas minimas x y
y del archivo d1
MaxD2=max(D2);

xmin=min(MinD1(1),MinD2(1));
ymin=min(MinD1(2),MinD2(2));
xmax=max(MaxD1(1),MaxD2(1));
ymax=max(MaxD1(2),MaxD2(2));

M1=Malla(Archivo1,num,res,true,true,[xmin,xmax,ymin,ymax],zoom);
M2=Malla(Archivo2,num,res,true,true,[xmin,xmax,ymin,ymax],zoom);

X=M1.xx;
Y=M1.yy;
F1=M1.FuncionT;
F2=M2.FuncionT;

F1c=M1.CentroideMax;
F2c=M2.CentroideMax;

FTCmax=max([M1.Cmax,M2.Cmax]);
```

```

FM1=(F1>F2).*F1;
FM2=(F2>F1).*F2;

figure
surf(X,Y,FM1,'FaceColor',[0 0 255]/255,'LineWidth',0.01);axis([xmin
xmax ymin ymax]);
hold on;
surf(X,Y,FM2,'FaceColor',[0 255 0]/255,'LineWidth',0.01);

plot3(F1c(1),F1c(2),FTCmax,'Color','r','Marker','o','LineWidth',5,'Lin
eStyle','none');
plot3(F2c(1),F2c(2),FTCmax,'Color','g','Marker','o','LineWidth',5,'Lin
eStyle','none');

set(gca,'YDir','reverse'); %Revertir el eje Y
xlabel('X Micras'),ylabel('Y Micras')

h =
legend(strrep(Archivo1,'.xls',''),strrep(Archivo2,'.xls',''),strcat('C
entroide',' ',strrep(Archivo1,'.xls','')) ,strcat('Centroide','
',strrep(Archivo2,'.xls','')),2,'Location','NorthEast');
set(h,'Interpreter','none');
set(h,'FontSize',6);

h=gcf;
title(strcat(strrep(Archivo1,'.xls',''),'y',strrep(Archivo2,'.xls','')
,sprintf('(%i X %i)',num,num),'3D'));
set(h,'Units','pixels');
set(h,'Position',[0 0 750 750]);

view(-45,76);
saveas(h,strcat(strrep(Archivo1,'.xls',''),'y',strrep(Archivo2,'.xls',
''),sprintf('(%i X %i)',num,num),'3D','.fig'),'fig');
print(strcat(strrep(Archivo1,'.xls',''),'y',strrep(Archivo2,'.xls','')
,sprintf('(%i X %i)',num,num),'3D','.png','-dpng','-r600'));

end

```

APÉNDICE 4

Valores de los porcentajes, dimensión fractal, *prefactor de forma a* y *parámetro de las fibras de los fascículos del m. EDL* clasificadas por la técnica histoenzimática de ATPasa

		Porcentaje de fibras (%)		Dimensión		a		c	
		C	D	C	D	C	D	C	D
	L	8.62±1.58	4.45±0.65						
F2	I	59.66±4.54	57.66±5.21	1.79±0.04	1.80±0.01	0.16±0.03	0.20±0.02	6.54±1.00	5.08±1.01
	R	31.72±5.42	37.88±5.39	1.75±0.03	1.70±0.05	0.12±0.03	0.21±0.04	9.48±0.56	6.72±0.54
	L	2.08±0.28	3.08±0.59						
F3	I	51.89±5.45	67.24±4.08	1.78±0.02	1.75±0.03	0.20±0.03	0.26±0.03	5.70±2.13	1.44±2.78
	R	46.03±5.53	29.68±4.07	1.73±0.3	1.54±0.08	0.22±0.03	0.38±0.11	5.50±1.22	8.00±2.45
	L	1.35±0.16	4.11±1.45						
F4	I	65.33±2.38	53.63±3.66	1.75±0.04	1.78±0.02	0.35±0.10	0.26±0.04	- 2.71±4.87	2.02±2.75
	R	33.32±2.48	42.25±4.00	1.68±0.04	1.74±0.02	0.27±0.09	0.25±0.07	7.66±3.07	4.98±2.08
	L	1.08±0.18	0.71±0.09						
F5	I	45.25±2.06	54.41±1.10	1.84±0.01	1.81±0.01	0.17±0.01	0.29±0.02	6.65±0.90	0.11±1.42
	R	53.67±2.03	44.88±1.08	1.79±0.01	1.80±0.01	0.25±0.02	0.28±0.02	-1.81±1.66	0.75±1.01

APÉNDICE 5

Diferencias significativas entre los porcentajes de fibras de los fascículos del m. EDL clasificadas por la técnica de ATPasa alcalina (pH 9.4)

		F2				F3				F4				F5							
		L		I		R		L		I		R		L		I		R			
		C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D		
Porcentajes	L	C																			
		D																			
	F2	I	C	****	****																
			D	****	****																
	R	C	**	**	***	**															
		D	***	****	*	*															
F3	L	C			****	****	****	****													
		D			****	****	****	****													
	I	C	****	****					**		****	****									
		D	****	****					****	****	****	****									
	R	C	****	****							****	****	**								
		D	****	****	****	****			***	***	**	****									
F4	L	C			****	****	****	****			****	****	****	****							
		D			****	****	****	****			****	****	****	****							
	I	C	****	****			****	****	****	****			*	****	****	****					
		D	****	****			**		****	****			***	****	****	*					
	R	C	****	****	****	***			****	****	*	****			****	****	****	****			
		D	****	****					****	****		***			****	****	****				
F5	L	C			****	****	****	****			****	****	****	****			****	****	****	****	
		D			****	****	****	****			****	****	****	****			****	****	****	****	
	I	C	****	****					****	****	**			****	****	**			****	****	
		D	****	****			***		****	****			****	****		**			****	****	***
	R	C	****	****			**		****	****			***	****	****		**		****	****	**
		D	****	****					****	****	***			****	****	**			****	****	***

Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. $F_{15,117} = 5.403$. $N = 6$, excepto en F4 D, donde $N = 5$.

APÉNDICE 6

Diferencias significativas entre la dimensión fractal de las fibras intermedias y rápidas de los fascículos del m. *EDL*

Dimensión		F2				F3											
		I		R		I		R		I		R		I		R	
		C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
F2	I	C															
	D	D															
F3	I	C															
	D	D	***	***	**	***	**		*								
F4	I	C															**
	D	D															**
F5	I	C															*
	D	D															****
F5	I	C															****
	D	D															***
F5	I	C															****
	D	D															****

Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. $F_{9,78} = 2.17$. $N = 6$, excepto en F4 D, donde $N = 5$.

APÉNDICE 7

Valores de los porcentajes, dimensión fractal, *prefactor de forma a* y parámetro de las fibras de los fascículos del m. *EDL* clasificadas por la técnica de NADH-TR

		Porcentaje de fibras		Dimensión		a		c	
		C	D	C	D	C	D	C	D
F2	O	55.28±0.88	51.76±1.57	1.82±0.01	1.81±0.03	0.21±0.02	0.16±0.02	6.38±0.11	10.52±1.21
	G	44.72±0.88	48.24±1.57	1.81±0.01	1.81±0.03	0.17±0.01	0.15±0.02	3.47±0.56	6.06±0.63
F3	O	47.62±0.88	52.40±1.01	1.75±0.03	1.76±0.02	0.16±0.03	0.24±0.02	8.48±1.10	5.96±1.57
	G	52.38±0.88	47.60±1.01	7.79±0.01	1.79±0.02	0.15±0.03	0.22±0.01	3.01±1.02	2.56±1.27
F4	O	46.56±0.80	40.50±2.46	1.76±0.03	1.68±0.04	0.24±0.05	0.23±0.04	6.27±2.24	10.86±0.79
	G	53.44±0.80	59.50±2.46	1.76±0.03	1.76±0.02	0.28±0.07	0.24±0.04	2.32±3.20	1.29±2.45
F5	O	42.94±2.04	36.73±2.44	1.84±0.01	1.82±0.01	0.15±0.02	0.11±0.02	8.12±1.30	10.89±0.87
	G	57.06±2.04	63.27±2.44	1.83±0.01	1.81±0.01	0.20±0.02	0.19±0.02	0.83±0.91	1.10±1.41

APÉNDICE 8

Diferencias significativas entre los porcentajes de fibras de los fascículos del m. *EDL* clasificadas por la técnica histoenzimática de NADH-TR

Porcentajes		F2				F3				F4				F5			
		O		G		O		G		O		G		O		G	
		C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
F2	O	C															
	D	C	****	**													
F3	G	D	**														
	O	C					**										
F4	D	C					**										
	C	D					**	**									
F5	G	D					**	**									
	O	C	*														
F2	D	C															
	C	D	****	***		*											
F3	G	D															
	O	C	****	***	****	***	***			****	***	****					
F4	D	C	***	*				*	*				**	****			
	C	D	****	****		***	*	*	*	**	****		****	****	**	****	
F5	G	D															
	O	C	****	****	****	****	****	**	**	****	****	**	****	****	****	****	

Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. $F_{9,80} = 21.92$. $N = 6$.

APÉNDICE 10

Diferencias significativas entre los porcentajes de fibras de los fascículos del m. *EDL* determinando el metabolismo de las fibras intermedias

		F2								F3								F4								F5							
		L		IO		IG		R		L		IO		IG		R		L		IO		IG		R		L		IO		IG		R	
		C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
Porcentajes	L	C																															
		D																															
	IO	C	****	****																													
		D	****	****																													
	IG	C			****	****																											
		D			****	****																											
	R	C	**	***			*	*																									
		D	***	****			**	***																									
	F2	L	C			****	****			****	****																						
			D			****	****			****	****		****																				
		IO	C	****	****			****	****		****																						
			D	****	****			****	****	*	****	****																					
IG		C			****	****			****	****		****	****																				
		D			****	****			**	*	****	****																					
R		C	****	****			****	****		****	****		****	****		****	****																
		D	**	****		*	*			****	****	*	**	***		*																	
F3		L	C			****	****			****	****		****	****		****	****		****	****													
			D			****	****			****	****		****	****		****	****		****	****		****											
		IO	C	****	****			****	****		****	****																					
			D	****	****			****	****	*	****	****																					
	IG	C			****	****			****	****		****	****																				
		D			****	****			**	*	****	****																					
	R	C	****	****			****	****		****	****		****	****		****	****		****	****													
		D	**	****		*	*			****	****	*	**	***		*																	
	F4	L	C			****	****			****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****	****							
			D			****	****			****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****					
		IO	C	****	****			****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****	****						
			D	****	****			**	***		****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****	****						
IG		C			****	****			*	*	****	****		****	****		****	****		**	*	****	*										
		D			****	****			*		****	****		****	****		****	****		*		****	**										
R		C	*****	****			**	***		****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****		*			
		D	*****	****			****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****	****		****		***			

		F2								F3								F4								F5								
		L		IO		IG		R		L		IO		IG		R		L		IO		IG		R		L		IO		IG		R		
		C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	
F5	L	C			****	****			****	****			****	****			****	****			****	****	*		****	****								
		D			****	****			****	****			****	****			****	****			****	****	*		****	****								
	IO	C	****	****			****	****			****	****			****	***			****	****			**	***			****	****						
		D	****	****			***	****			****	****			****	*			****	****				*			****	****						
	IG	C			****	****			****	****			****	****			****	****			****	****			****	****			****	****				
		D			****	****				*			****	****			***				****				***		****	****	****	****	****			
	R	C	****	****			****	****	**		****	****			****	****	***		****	****			****	****	**		****	****	***	****	****	****	****	
		D	****	****			****	****			****	****			****	****			****	****			****	****			****	****		*	***	****	*	

Diferencias significativas ($P \leq 0.05$) determinadas con la prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. $F_{21,156} = 4.029$. $N = 6$.