



Tesis doctoral

**ESTUDIO DE FATIGA MUSCULAR MEDIANTE
ESTIMULACIÓN DE BAJA FRECUENCIA**

José Humberto Maulén Arroyo

Barcelona, Noviembre de 2005

Memoria presentada por

José Maulén Arroyo

para optar al grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Trabajo realizado en la Unidad de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas I, bajo la dirección de la Dra. Roser Cussó Frequet

Barcelona, Noviembre de 2005

Directora de tesis

Dra. Roser Cussó Fresquet

Autor

José Maulén Arroyo

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL MAULE
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS
CHILE
jmaulen@ucm.cl**

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Roser Cussó Fresquet quien tuvo la gentileza de invitarme a realizar la tesis doctoral en la Unidad de Bioquímica del Departamento de Ciencias Fisiológicas I, por su amistad y por acogerme en su distinguida familia.

Al Dr. José Luis Solana por su amistad y apoyo estadístico.

A los Drs. Joan Cadefau Surroca y Joan Parra Farré por sus consejos sobre el tema de investigación.

A los Drs. Fernando Climent Romeo y José Carreras Barnés de quienes recibí permanente apoyo.

Al Dr. Pablo Pérez de la Ossa por su amistad, consejos y gratísimas conversaciones.

Al doctorando Jordi Rovira Juárez con quien compartí largas horas de laboratorio y por su amistad.

Al doctorando José María Irimia de quien recibí apoyo y amistad.

Al magister señor Mario Guerrero, gracias por tus consejos y amistad.

A Rosario, Clarita, María José, Elizenda.

La lista es larguísima y me temo que voy a olvidar a más de uno, por ello les digo a todos ustedes gracias por haberme acompañado en esta tarea. Estar lejos de la patria, de los amigos y de la familia es muy duro. Superé los momentos difíciles porque me sentí arropado por ustedes. En Chile tenéis un amigo.

“El agradecimiento más importante es para mi señora Mireya y mi hijo Marcelo quienes han tenido una paciencia infinita para soportar el afán de este profesor por saber cada vez más. Siempre les digo, esta es la última vez !...será...?. Gracias a Carmen Gloria mi niña querida que se casó con mi hijo un día 15 de diciembre de 2001, tarde de sábado, mientras hacía experimentos en Barcelona y, a Isidora Pía Emilia y Clemente Marcelo, dos nietazos que nacieron junto con esta tesis doctoral”.



Esta foto la tomé en Parc Güell en un día de paseo con Mireya, cuando ví esta escala me pareció que representaba la tarea en la que estaba empeñado. Debía superar una serie de etapas para realizar la tesis doctoral y para vivir alejado de mi familia. En ella se notan zonas de penumbra que representan las dificultades a vencer, pero, allá al fondo y en la altura se vislumbra una luz maravillosa que pareciera representar el fin de una etapa de vida y la esperanza de poder decir tarea cumplida. Lo que hay más allá del fin de la escala es el trabajo que debo realizar en la Universidad Católica del Maule para dar cuenta de toda la experiencia adquirida.

Gracias Dios mío por acompañarme, esa luz al final eres Tú, fuiste mi gran fortaleza.

ABREVIATURAS

| | |
|---|----------------------|
| Acido perclórico | PCA |
| Acido 2-tiobarbitúrico | TBA |
| Acido tricloroacético | TCA |
| Acidos grasos poliinsaturados | AGPI |
| Albúmina bovina sérica | BSA |
| Aldolasa | ALD |
| Butilatohidroxitolueno | BHT |
| Catalasa | CAT |
| Creatina quinasa | CK |
| Dihidroxiacetonafofato | DHAP |
| Etilendiaminotetracetato | EDTA |
| Fast fatigable | FF |
| Fast intermediate | FI |
| Fast resistant | FR |
| Fast oxidative glycolytic | FOG |
| Fast glycolytic | FG |
| Fosfato inorgánico | Pi |
| Fosfocreatina | PCr |
| Fosfoenolpiruvato | PEP |
| Fosfoglucoisomerasa | PGI |
| Fosfoglucomutasa | PGM |
| Fructosa-6-fosfato | Fru6P |
| Fructosa 1,6 bisfosfato | Fru1,6P ₂ |
| Fructosa 2,6 bisfosfato | Fru2,6P ₂ |
| Gliceraldehído-3-fosfato | Gli3P |
| Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa | Gli3PDH |
| Glucosa-6-fosfato | Glc6P |
| Glucosa bisfosfato | Glc1,6P ₂ |
| Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa | G6PDH |
| Glutación peroxidasa | GPx |
| Glutación reductasa | GR |
| Hexoquinasa | HK |
| Lactato deshidrogenasa | LDH |
| Malondialdehído | MDA |
| Piruvato quinasa | PK |
| Pulsos por segundo | pps |
| Radicales libres de oxígeno | RLO |
| Rápida oxidativa glucolítica | FOG |
| Receptores de dihidropiridina | DHPR |
| Receptores de rianodina | RyR |
| Slow | S |
| Slow oxidative | SO |
| Succinate dehydrogenase | SDH |
| Superóxidodismutasa | SOD |
| 1,1,3,3,-tetraetoxipropano | TEP |
| Triosafofosatoisomerasa | TPI |

PRESENTACIÓN GENERAL

Sistema nervioso y músculo esquelético conforman un conjunto entre cuyas partes se establece una rica interacción trófica, de manera tal que las propiedades estructurales, bioquímicas y funcionales de uno y otro son dependientes entre sí para desarrollar y mantener en el tiempo las características de cada uno. Cuando uno de los dos experimenta una modificación el otro también se ve afectado. Ejemplos clásicos que ilustran lo anterior son la denervación y la reinervación cruzada. Por otra parte, el entrenamiento físico y sus efectos sobre el músculo esquelético son también un buen ejemplo de la interacción entre ambos tipos de tejido. Es sabido que el entrenamiento físico aeróbico modifica de tal manera las propiedades de las células musculares esqueléticas que finalmente los músculos implicados se tornan más delgados. Por el contrario el entrenamiento físico anaeróbico, especialmente el de potencia muscular, desarrolla músculos de mayor volumen, es decir, ocurre una hipertrofia. Desde el punto de vista de las neuronas motoras que inervan a las células musculares esqueléticas, la información que existe sobre sus modificaciones ante cualquier tipo de entrenamiento físico es más bien escasa; pero, un razonamiento a priori indica que si las células musculares experimentan cambios, por qué no podrían experimentarlo también las neuronas motoras, de cuyo funcionamiento depende la actividad contráctil del músculo.

El estudio de las modificaciones agudas y adaptaciones crónicas que experimenta el músculo esquelético sometido a una variedad de paradigmas experimentales orientados a averiguar sus capacidades y descubrir los mecanismos de funcionamiento es motivo de muchísima investigación. Hoy día el nivel de la investigación es muy avanzado llegando hasta el campo de la genética molecular. Sin embargo, todavía hay problemas sin resolver como es el o los lugares de fallo que conducen a la aparición de fatiga muscular, cómo se podría ayudar a que se retardara su aparición o, una vez establecida qué hacer para una mejor recuperación.

Una forma de estudiar el tema de manera controlada y rápida es provocar la aparición de fatiga muscular mediante el uso de la estimulación eléctrica del nervio para activar el músculo, lo que se realiza fundamentalmente en modelo animal. En el presente estudio se trabajó con modelo nervio peroneo y músculo tibial anterior de conejo.

El objetivo general del trabajo fue caracterizar la respuesta del músculo rápido tibial anterior sometido a tiempos de estimulación breve para estudiar la instauración de la fatiga muscular y su recuperación, observar si esta fatiga es de corta o larga duración y observar que parámetros se modifican a fin de encontrar una causa para esta fatiga y su recuperación.

Como objetivos específicos se consideraron: 1.-Determinar el índice de fatiga en músculos tibial anterior. 2.-Determinar la amplitud del potencial motor evocado u onda M. 3.-Determinar el estado metabólico que acompaña a cada situación. 4.-Determinar si la formación de radicales libres acompaña a los cambios

metabólicos en la instauración de la fatiga. 5.-Determinar si ocurren cambios estructurales en RS que acompañen a la fatiga muscular.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1.-INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. 1.-LA UNIDAD MOTORA | 1 |
| 1. 2.-LA MOTONEURONA ALFA | 4 |
| 1. 3.-ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN – CONTRACCIÓN | 5 |
| 1. 4.-ENERGÉTICA DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR | 6 |
| 1. 5.-LAS FIBRAS MUSCULARES EXTRAFUSALES TIPO I Y TIPO II | 7 |
| 1. 6.-ADAPTACIONES DE LA UNIDAD MOTORA | 10 |
| 1. 7.-LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE BAJA FRECUENCIA (EBF) | 11 |
| 1. 8.-EFECTOS DE LA EBF SOBRE EL MÚSCULO ESQUELÉTICO | 12 |
| 1.8.1.-Adaptaciones macroscópicas | 12 |
| 1.8.2.-Adaptaciones ultraestructurales | 13 |
| 1.8.3.-Adaptaciones moleculares | 15 |
| 1.8.4.-Adaptaciones metabólicas | 17 |
| 1.8.5.-Adaptaciones contráctiles | 18 |
| 1. 9.-FATIGA MUSCULAR. | 20 |
| 1.9.1.-Fatiga de alta y baja frecuencia (FAF y FBF) | 22 |
| 1.9.2.-Fatiga de alta frecuencia (FAF) | 22 |
| 1.9.3.-Fatiga de baja frecuencia (FBF) | 24 |
| 1. 10.-RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (RLO) | 26 |
| 1.10.1.-Introducción | 26 |
| 1.10.2.-Estrés oxidativo inducido por ejercicio | 29 |
| 1.10.3.-Adaptación de los sistemas antioxidantes a una sesión de ejercicio | 31 |
| 1.10.4.-Adaptación de los sistemas antioxidantes inducidos por el entrenamiento | 31 |
| 1.11.-RESUMEN CAUSAS FATIGA MSCULAR | 32 |
| 1.12.-OBJETIVO GENERAL | 34 |
| 1.13.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 34 |
| 1.14.-HIPÓTESIS | 34 |
| 2.-MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 2.1.-Animales de experimentación, anestesia e implante de electrodos | 35 |
| 2.2.-Protocolo de estimulación eléctrica y grupos experimentales | 36 |
| 2.3.-Obtención del músculo | 37 |

| | |
|--|----|
| 2.4.-Pulverización del músculo | 38 |
| 2.5.-Extracción de metabolitos | 38 |
| 2.6.-Soluciones estándar | 38 |
| 2.7.-Determinación de ATP y PCr | 38 |
| 2.8.- Determinación de creatina | 39 |
| 2.9.-Determinación de piruvato | 40 |
| 2.10.-Determinación de lactato | 40 |
| 2.11.-Determinación de Glc6P, Glc1P, Fru6P y glucosa | 41 |
| 2.12.-Determinación de Gli3P, DHAP y Fru1,6P ₂ | 42 |
| 2.13.-Determinación de proglucógeno (PG) y macroglucógeno (MG) | 43 |
| 2.13.1.-Extracción de PG y MG | 43 |
| 2.13.2.-Solución estándar | 43 |
| 2.14.-Protocolo para obtener fracción microsomal y subfracciones de retículo sarcoplasmático | 44 |
| 2.15.-Protocolo para la valoración de proteínas totales | 44 |
| 2.16.-Protocolo para la valoración de MDA | 45 |
| 2.17.-Obtención de músculo para aislar fracciones de RS mediante gradiente de sacarosa | 46 |
| 2.17.1.-Preparación del músculo para aislar fracciones de RS | 46 |
| 2.17.2.-Preparación de reactivos y drogas | 46 |
| 2.17.3.-Preparación de músculo y pellet para gradiente de sacarosa | 47 |
| 2.18.-Protocolo para el registro del test de fatiga muscular | 48 |
| 2.19.-Protocolo para estudio de la respuesta motora directa (onda M) | 50 |
| 2.20.-Análisis estadístico | 51 |
| 3.-RESULTADOS ONDA M | 52 |
| 4.-RESULTADOS FATIGA MUSCULAR | 53 |
| 5.-RESULTADOS GRADIENTE DE SACAROSA DE RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO | 56 |
| 6.-RESULTADOS PEROXIDACIÓN LIPÍDICA | 58 |
| 7.-RESULTADOS METABOLITOS | 59 |
| 7.1.-Adenosintrifosfato (ATP) | 60 |
| 7.2.-Cálculo del uso de ATP | 61 |
| 7.3.-Cálculo del ADP libre | 62 |
| 7.4.-Cálculo del AMP libre | 64 |
| 7.5.-Nucleótidos totales | 67 |
| 7.6.-Fosfocreatina (PCr) | 68 |
| 7.7.-Creatina | 69 |

| | |
|---|-----|
| 7.8.-Creatina total | 70 |
| 7.9.-Proglucógeno (PG) | 74 |
| 7.10.-Macroglucógeno (MG) | 75 |
| 7.11.-Glucógeno total | 76 |
| 7.12.-Glucosa | 77 |
| 7.13.-Glucosa-1-fosfato (Glc1P) | 78 |
| 7.14.-Glucosa-6-fosfato (Glc6P) | 79 |
| 7.15.-Fructosa-6-fosfato (Fru6P) | 80 |
| 7.16.-Fructosa-1,6-bisfosfato (Fru1,6P ₂) | 82 |
| 7.17.-Dihidroxiacetonafosfato (DHAP) | 83 |
| 7.18.-Gliceraldehído-3-fosfato (Gli3P) | 84 |
| 7.19.-Piruvato | 85 |
| 7.20.-Lactato | 86 |
| 7.21.-Cálculo del pH | 87 |
| 7.22.-Uso de la vía glucogenolítica | 88 |
| 7.23.-Uso de la vía glucolítica | 90 |
| 7.24.-Cuociente uso vía glucogenolítica / uso vía glucolítica | 91 |
| 8.-DISCUSIÓN | 92 |
| 9.-CONCLUSIONES | 103 |
| 10.-BIBLIOGRAFÍA | 104 |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La revisión bibliográfica se realizó de manera de mostrar antecedentes sobre los componentes de la unidad motora, la respuesta al uso y desuso mediante diversos modelos experimentales, en particular el de la estimulación eléctrica indirecta a baja frecuencia.

1. 1.-LA UNIDAD MOTORA.

El músculo esquelético representa alrededor del 40 % del peso corporal, en condiciones normales se contrae y relaja de manera voluntaria bajo el comando del SNC. Los músculos están compuesto por unas pocas a cientos de células inervadas por motoneuronas α . Cada motoneurona α inerva un cierto número de células musculares. El conjunto formado por motoneurona α y las células musculares recibe el nombre de unidad motora (UM).

Mediante electromiografía (EMG) se detectó que se produce una activación gradual de células cuando aumenta progresivamente la intención de realizar un movimiento, la graduación de la contracción radica en un aumento de la frecuencia de descarga en cada UM y en el reclutamiento de UM.

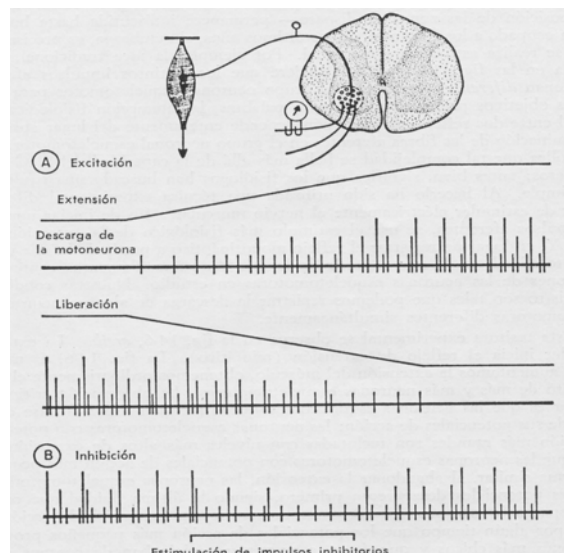
La EMG se usa para medir potenciales de acción de las UM, particularmente después de denervación-reinervación (**Stalberg & Dioszeghy, 1991; Wiechers, 1990**). El movimiento de un electrodo de EMG a través del músculo permite un análisis continuo de los potenciales de acción de las UM a lo largo del territorio de la unidad, un aumento en la amplitud media de los potenciales de la UM se interpreta como un aumento en la densidad de fibras dentro del territorio de la UM (**Stalberg & Antoni, 1980**). Este tipo de registro sugiere que una UM se distribuye en sólo una porción de la sección transversal del músculo (**Stalberg, 1980**). Además, los análisis EMG revelan la presencia de áreas de silencio, las que muy probablemente corresponden a UM depletadas de glucógeno.

Hay músculos (sóleo) donde el incremento de fuerza se logra principalmente por el reclutamiento adicional de UM y depende menos de la modulación de la frecuencia de descarga, mecanismo que opera en el control postural; mientras que las UM involucradas en movimientos rápidos muestran una mayor variabilidad de la tasa de descarga de potenciales de acción. El sóleo de conejos está activo si el animal está parado o caminando, mientras que el tibial anterior o el gastrocnemius se activan sólo durante la locomoción (**Walmsley et al., 1978**). Las UM activas por largo de tiempo se denominan tónicas, mientras que las que descargan por breve tiempo se denominan fásicas. Las UM reclutadas con pequeños esfuerzos y que desarrollan fuerzas pequeñas son diferentes de las que se usan cuando el músculo es requerido para producir grandes fuerzas.

Debido a estas diferencias, las UM de mamíferos fueron clasificadas como lentas resistentes a la fatiga (S), rápidas resistentes a la fatiga (FR), rápidas de fatiga intermedia (FI) y rápidas fatigables (FF) (**Burke et al., 1977; Buchthal & Schmalbruch, 1980**).

El estudio de UM aisladas demostró que existe un amplio rango de propiedades contráctiles, consistente con estudios histoquímicos de fibras musculares únicas que han demostrado una considerable heterogeneidad (**Edstrom & Kugelberg, 1968; Henneman & Mendell, 1981; Kugelberg & Lindgren, 1979**). Las UM se reclutan en un orden de acuerdo a su tamaño; para aumentar la fuerza primero se activan las pequeñas, luego las intermedias y finalmente las grandes, para disminuir la fuerza se desactivan exactamente al revés (**Henneman & Mendell, 1981**). La activación de distintos tipos de UM depende de aferencias sinápticas, tamaño y propiedades biofísicas del soma de las motoneuronas α (**Freund, 1983**) (Figura 1.1).

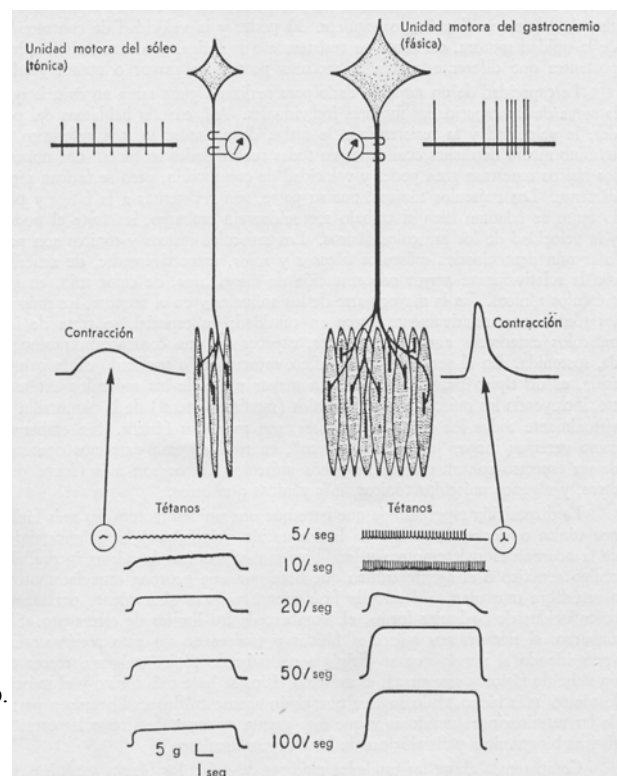
Figura 1.1.-En el experimento se demuestra el orden en que se reclutan las UM. Se tira del tendón distal y se registra potenciales en axones de motoneuronas α . El estiramiento del músculo activa husos musculares los que por vía Ia estimulan los somas de motoneurona α . Según el tamaño de los potenciales de acción, correlacionados con el calibre de los axones motores, las UM se activan en el orden S, FR y FF. Cuando se libera al músculo la desactivación ocurre en forma inversa. (Fisiología del Sistema Nervioso, Eyzaguirre C y Fidone S, Ed. Médica Panamericana, Cap. 14 Integración sensoriomotora a nivel segmentario, pp. 250, 1977).



Las fibras musculares inervadas por una motoneurona α particular presentan características estructurales, metabólicas y contráctiles que las hacen similares entre sí; por el contrario, cuando se comparan fibras musculares inervadas por distintos tipos de motoneuronas α resulta que se diferencian notablemente. Estas diferencias hicieron pensar en la posibilidad que existiese un control del fenotipo muscular por parte de las motoneuronas α . Se demostró que diferencias en la velocidad de contracción de músculos lento y rápido surgen durante el desarrollo neonatal y que puede ser alterado, incluso en etapa adulta, mediante reinervación cruzada (**Pette & Vrbová, 1985; Pette & Vrbová, 1992**). Sin embargo, como las UM demuestran un amplio rango de propiedades, la varianza de las propiedades de las fibras musculares dentro de las UM es menor que entre diferentes unidades. Esto es consistente con la determinación neural de las propiedades del músculo, apoyado además por la baja varianza de la actividad de enzimas metabólicas observada dentro de fibras musculares de la unidad cuando se compara con fibras musculares de otra unidad (**Martin et al., 1988; Nemeth et al., 1981**;

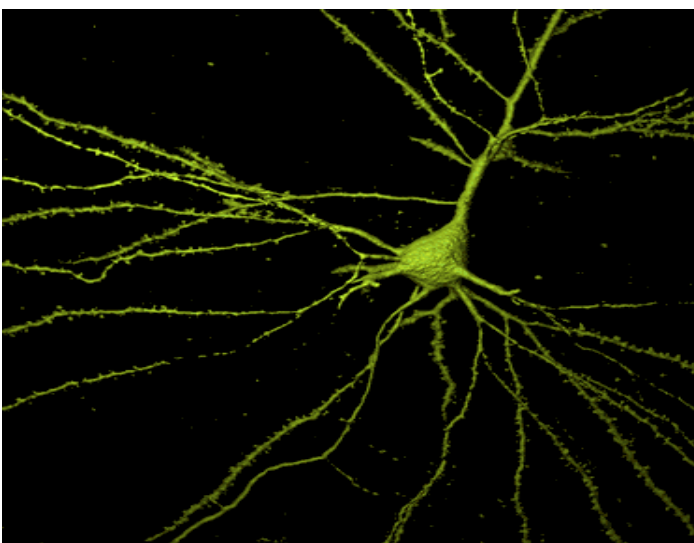
Nemeth et al., 1986). No obstante, la varianza dentro de las unidades fue mayor que el esperado si las propiedades fueran reguladas solamente por el nervio (**Martin et al., 1988**). Similarmente, aunque el rango de tamaño de la fibra muscular fue generalmente pequeño dentro de una UM, el rango para el mismo tipo de fibra en todas las partes del músculo fue tan grande como 5 veces (**Martin et al., 1988; Totossy de Zepetnek et al., 1992a**). El tamaño de cualquier tipo de fibra muscular varía de acuerdo a la región del músculo en la cual está localizada (**Rafuse, 1993; Totossy de Zepetnek et al., 1992a**), sugiriendo que influencias locales contribuyen a determinar el tamaño de la fibra muscular. Estos hallazgos sugieren que la motoneurona α no puede ejercer un control total sobre las propiedades de las fibras musculares. La estructura de la UM puede tener un rol importante en la definición de su función. El calibre y longitud de las fibras musculares en una UM, en diferentes UM y en diferentes músculos, el territorio que ocupa una UM y la distribución espacial de sus fibras musculares son factores a considerar para entender la capacidad de trabajo de los distintos tipos de UM y su contribución a la capacidad contráctil del músculo. Se sugiere que como resultado de la integración de múltiples niveles de organización estructural y fisiológica, probablemente emergen propiedades mecánicas únicas de las UM (**Monti et al., 2001**) (Figura 1.2).

Figura 1.2.-Se comparan características estructurales y funcionales de dos UM, típica de músculo lento sóleo (tipo S) y de músculo rápido gastrocnemius (tipo FF). En la tipo S la motoneurona es pequeña e inerva pocas fibras musculares también pequeñas. En la tipo FF la motoneurona es grande e inerva más fibras musculares de mayor calibre. La estimulación del soma pequeño produce una descarga de baja frecuencia, en cambio la estimulación del soma grande produce trenes de potenciales de acción de mayor frecuencia. La sacudida de las fibras musculares pequeñas produce una fuerza menor que las grandes y, los tiempos de contracción y relajación también son menores. La estimulación tetánica genera menor tensión en las fibras musculares pequeñas. (Fisiología del Sistema Nervioso, Eyzaguirre C y Fidone S, Ed. Médica Panamericana, Cap. 16 Organización de la unidad motora: músculos tónicos y fásicos, pp. 282, 1977).



1. 2.-LA MOTONEURONA ALFA.

Figura 1.3.-En el asta anterior del cordón espinal se encuentran los somas, dendritas y parte del axón de las motoneuronas alfa. Los somas difieren en tamaño de manera que hay pequeños, intermedios y grandes. Características biofísicas de la membrana de los tipos de motoneurona se relacionan con características contráctiles de las fibras musculares. Además, las motoneuronas sintetizan sustancias tróficas que inciden en propiedades de las fibras musculares. La fotografía muestra una “elegante” técnica para demostrar soma, dendritas, espinas sinápticas y axón de una neurona.



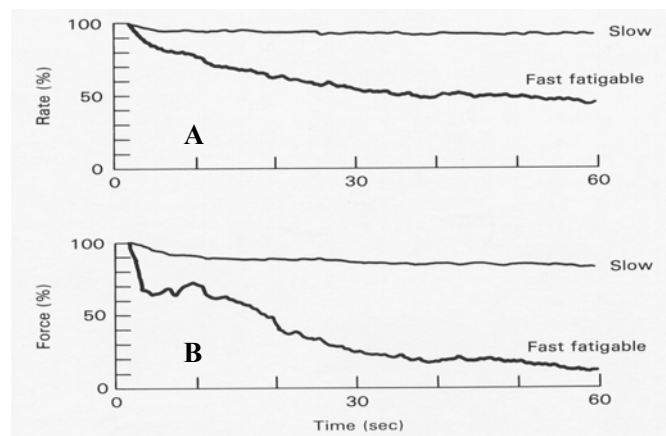
De acuerdo al tipo de UM las motoneuronas α (Figura 1.3) se diferencian en cuanto tamaño del soma, calibre del axón y ramificación del telodendrón. En estado adulto cada ramificación inerva sólo una fibra muscular, de manera que las pequeñas inervan pocas fibras musculares, en cambio las grandes inervan un número mayor. Los valores promedio del tamaño del soma, diámetro del axón, área total de membrana y velocidad de conducción son bajos en motoneuronas que inervan fibras lentas comparadas con aquellas que inervan fibras rápidas. La resistencia eléctrica y la duración de la hiperpolarización son mayores en motoneuronas que inervan fibras lentas (**Fleshman et al, 1981**). La duración de la hiperpolarización limita la frecuencia máxima a la que pueden descargar las motoneuronas (**Gustafsson, 1974**). La diferencia en la frecuencia de descarga entre motoneuronas rápidas (30-60 pps) y lentas (10-20 pps) (**Fishbach & Robbins, 1969**) puede ser uno de los factores responsables de las propiedades contráctiles. La capacidad de las motoneuronas α para mantener la generación de potenciales de acción varía dependiendo del tipo de UM (**Kernell & Monster, 1982**), las motoneuronas α que inervan fibras tipo I descargan durante tiempo prolongado, en cambio las motoneuronas α que inervan fibras musculares tipo IIB muestran una caída importante de la frecuencia de descarga, tanto que a los 30 s disminuye en aproximadamente un 50 % para luego mantener ese nivel. El funcionamiento de las motoneuronas α se correlaciona con la fuerza que son capaces de desarrollar y mantener las fibras musculares. Las fibras musculares tipo I solo experimentan una leve disminución de la fuerza, en cambio las fibras musculares tipo IIB experimentan una caída rápida y luego una más lenta de forma que al cabo de 40 s sólo desarrollan un 20 % de la fuerza inicial. Entonces las motoneuronas α pequeñas imponen a las células musculares una actividad sostenida de baja frecuencia que se correlaciona muy bien con

sus capacidades contráctiles y metabólicas; en cambio las motoneuronas α grandes imponen a sus células musculares una actividad contráctil de mayor intensidad pero frente a la cual pueden responder por corto tiempo (Figura 1.4).

Hay poca información que correlacione estas propiedades fisiológicas y anatómicas de las motoneuronas con las actividades enzimáticas metabólicas; parece que hay sólo una débil correlación entre las actividades de ciertas enzimas con el tamaño del cuerpo celular (Sickles & McLendon, 1983; Burke et al., 1982; Henneman & Mendell, 1981). Queda por determinarse si estas diferencias en las actividades enzimáticas están relacionadas con el tipo de fibra muscular inervada. Sickles y Oblack observaron que la relación entre el metabolismo oxidativo y el tipo de UM es considerablemente más fuerte que el mostrado previamente entre el metabolismo oxidativo y el tamaño del soma neuronal, por lo tanto, variaciones en la eficiencia de la liberación de energía (paralelas al metabolismo oxidativo) se empareja al tipo de UM más que al tamaño del soma neuronal (Sickles & Oblak, 1984).

Figura 1.4.-En A se observa disminución progresiva de la frecuencia de descarga en motoneurona α de UM tipo FF. En motoneurona α de UM tipo S se mantiene sin variación, descarga a baja frecuencia debido a su hiperpolarización.

En B se observa que en el transcurso del tiempo las fibras tipo IID muestran una fatiga mucho mayor



1. 3.-ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN – CONTRACCIÓN.

Las fibras musculares extrafusales, tipo I y II, son inervadas por motoneuronas α ubicadas en el asta anterior del cordón espinal, las ramificaciones terminales de los axones establecen sinapsis con cada fibra muscular. La membrana postsináptica es plegada lo cual contribuye a aumentar la superficie en la cual puede actuar el neurotransmisor. En los botones sinápticos hay mitocondrias que suministran energía principalmente para la síntesis de ACh. ACh se sintetiza y es almacenada en vesículas, unas 300.000 por placa motora. Ligada a la matriz de la lámina basal se encuentra acetilcolinesterasa, enzima que destruye a ACh. El potencial de acción de la motoneurona α provoca la liberación de aproximadamente 125 vesículas de ACh en un proceso dependiente de Ca^{2+} extracelular. ACh se une a receptores cerca de la entrada de los pliegues de la membrana postsináptica. Cada receptor es un complejo proteico de 275 kDa, las subunidades que lo componen atraviesan la membrana y

se sitúan formando un conducto tubular. El conducto permanece contraído hasta que se unen moléculas de ACh a las dos subunidades α , lo cual provoca un cambio conformacional que abre el canal. Por el canal pueden pasar todos los iones positivos importantes (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}), pero en la práctica fluyen muchos más iones Na^+ lo cual genera un potencial de placa motora terminal que inicia un potencial de acción el que se conduce por el sarcolema. La ACh liberada continúa activando receptores mientras persista en él, sin embargo, se elimina rápidamente mediante dos mecanismos, la mayor parte es destruida por acetilcolinesterasa y una pequeña parte difunde fuera del espacio sináptico.

En la fibra muscular los potenciales de acción penetran hasta la vecindad de las miofibrillas por los túbulos T. E un proceso en el que intervienen canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (de DHPR) en la membrana del túbulo T y canales de Ca^{2+} no dependientes de voltaje (de RyR) en la membrana de los sacos laterales del RS, el Ca^{2+} almacenado en los sacos laterales sale al sarcoplasma, a favor de gradiente. El aumento de la concentración de Ca^{2+} (desde $\sim 10^{-7}$ molar hasta $\sim 2 \times 10^{-4}$ molar) produce un aumento de la afinidad de la troponina C por el Ca^{2+} , esta unión provoca un cambio conformacional de troponina la que a su vez arrastra a tropomiosina. Los movimientos de troponina y tropomiosina exponen un sitio activo en actina al que se unen las cabezas de miosina. Otro lugar de las cabezas de miosina, una miosina ATPasa, hidroliza ATP, la energía liberada se usa para que las cabezas de miosina den un golpe de potencia, desde los 90° a los 45° , arrastrando a los miofilamentos delgados de actina entre los miofilamentos gruesos de miosina. Las cabezas de miosina se sueltan por efecto de la presencia de ATP, retornan a los 90° y se reinicia el proceso que se repite cíclicamente. Esto es la contracción muscular y la explicación se denomina “teoría de deslizamiento de miofilamentos”. Mientras el Ca^{2+} permanezca elevado en el sarcoplasma, lo cual depende de la llegada de potencial de acción al túbulo T, las cabezas de miosina seguirán dando golpes de potencia. Terminada la estimulación una bomba de Ca^{2+} situada en los túbulos longitudinales del RS bombea Ca^{2+} hacia su interior. Esta bomba puede concentrar unas 10.000 veces el Ca^{2+} ; además, en el RS calsecuestrina liga 40 veces más Ca^{2+} que el que debería hallarse en el estado iónico. La transferencia de Ca^{2+} al RS disminuye su concentración en el sarcoplasma y es que se pierde la afinidad de troponina C por Ca^{2+} , ésta experimenta un cambio conformacional que produce el arrastre de tropomiosina y su posicionamiento sobre el sitio activo de actina impidiendo la formación del complejo actina-miosina lo que provoca la relajación.

1. 4.-ENERGÉTICA DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.

La concentración de ATP presente en la fibra muscular, 7-8 mM aproximadamente, permite mantener la contracción durante 1 a 2 segundos como máximo. Una vez que el ATP se ha desdoblado a ADP, este es refosforilado para formar ATP en una fracción de segundo. Para esta refosforilación existen varias fuentes de energía.

La primera fuente es la PCr cuya cantidad es también muy pequeña, unas 5 veces mayor que la del ATP. La energía combinada del ATP y de la PCr es capaz de producir una contracción máxima durante 5 a 8 segundos.

La siguiente fuente de energía es el glucógeno muscular. La rápida degradación enzimática del glucógeno para liberar glucosa y llevarla hasta ácido pirúvico libera energía para convertir ADP en ATP, el cual puede ser utilizado directamente para proporcionar energía a la contracción muscular o para volver a llenar los depósitos de PCr. La importancia de este mecanismo es doble; en primer lugar, las reacciones tienen lugar en ausencia de oxígeno, en segundo lugar, la velocidad de formación de ATP es unas dos y media veces más rápida que cuando los nutrientes reaccionan con el oxígeno. La acumulación de productos finales de la glucólisis es tan elevada que la glucólisis por sí sola no puede mantener una contracción muscular sostenida durante más de 1 minuto aproximadamente.

La fuente final de energía es el metabolismo oxidativo; más del 95 % de la energía procede de éste. Los principales nutrientes consumidos son hidratos de carbono y grasas y, en casos excepcionales proteínas. En caso de actividad muscular máxima, durante muchas horas, la mayor proporción de energía procede de las grasas pero, para períodos de 2 a 4 horas, hasta la mitad de la energía puede proceder del glucógeno almacenado antes de que se agoten las reservas.

1. 5.-LAS FIBRAS MUSCULARES EXTRAFUSALES TIPO I Y TIPO II.

Los músculos lentos se distinguen de los rápidos por su color rojo, menor velocidad de contracción y mayor resistencia a las contracciones repetidas. El color rojo se debe a los altos niveles de mioglobina que contienen las fibras tipo I y por la densidad de la capilarización. Debido a la alta densidad de mitocondrias, estas fibras están capacitadas para realizar metabolismo oxidativo. Las fibras blancas o tipo II son de mayor tamaño y tienen menor cantidad de mioglobina, mitocondrias y de capilares, están más capacitadas para realizar metabolismo glucolítico. La heterogeneidad de las fibras musculares fue reconocida por la demostración histoquímica de diferencias en las intensidades de la reacción de miosina ATPasa, enzimas oxidativas, enzimas glucolíticas (**Brooke & Kaiser, 1970; Guth & Samaha, 1970**) que permitieron distinguir de 3 a 8 tipos de fibras (Figura 1.5). Los procedimientos histoquímicos se modificaron para discriminar solo 3 tipos de fibras y clasificarlas basado sólo en la ATPasa (**Guth & Samaha, 1970**), tipo I, IIA, IIB (IID) (**Brooke & Kaiser, 1970**) o en una combinación de ATPasa y enzimas metabólicas como tipos SO, FOG y FG (**Gollnick & Hodgson, 1986; Pette & Staron, 1990**). En un esfuerzo por conciliar un rango continuo de propiedades contráctiles con tres tipos histoquímicos diferentes, se usan las unidades lentas del músculo sóleo como un índice de comparación para distinguir unidad lenta de unidad rápida (**Henneman & Olson, 1965**). También se utiliza la prueba de la “depresión” para distinguir tipos de UM, en términos generales las UM lentas y rápidas pueden ser

distinguidas por sus característicos perfiles de fuerza en contracciones tetánicas no fusionadas (**Guillespie et al., 1986; Totosy de Zepetnek et al., 1992b**).

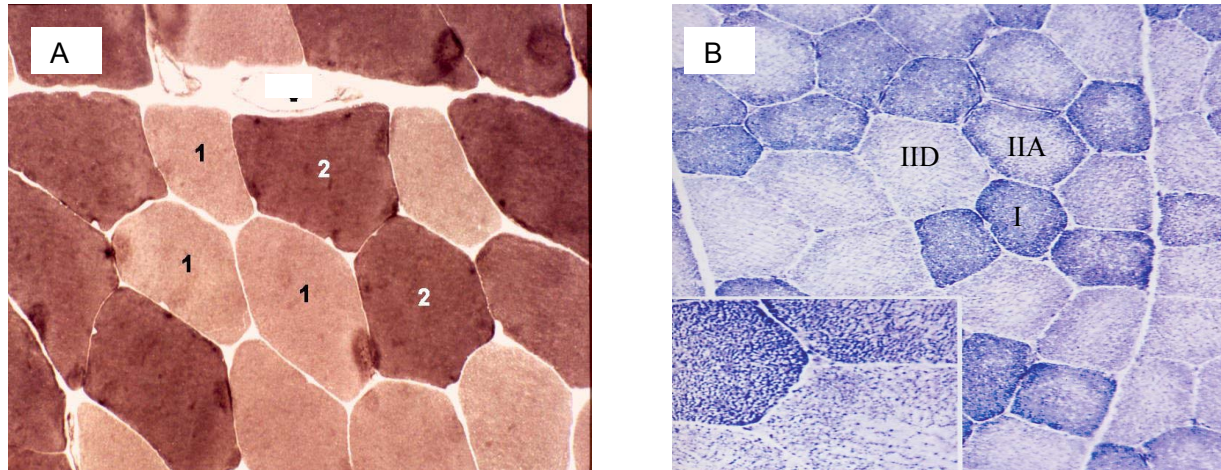


Figura 1.5.-En A se muestra técnica histoquímica para miosino ATPasa menos abundante en fibras tipo I (1) y más en fibras tipo II (2). En B se muestra técnica histoquímica para SDH más abundante en fibras tipo I, menos en IIA y mucho menos en IID.

La susceptibilidad a la fatiga se escogió como criterio para subdividir las unidades rápidas en resistentes a la fatiga (FR) y fatigable (FF), lo que proporciona una clasificación fisiológica que se corresponde con la división histoquímica de fibras tipo IIA (FOG) y IIB (FG) (**Burke, 1981**). En UM identificadas por la depleción del glucógeno, los tipos fisiológico e histoquímico se corresponden razonablemente bien (**Totosy de Zepetnek et al., 1992b**). Más recientemente, el análisis inmunohistoquímico, mediante el uso de anticuerpos contra MHC lenta y rápida, ha complementado el primitivo sistema de clasificación e identificado un cuarto tipo de fibra en músculo de rata, el tipo IIX, que está presente en UM clasificadas fisiológicamente como rápida de fatiga intermedia (FI) e histoquímicamente como rápida intermedia (**Larsson et al., 1991; Totosy de Zepetnek et al., 1992b**). Las fibras rápidas tienen bajas cantidades de mitocondrias y enzimas oxidativas, altas concentraciones de enzimas glucolíticas, una relativamente alta densidad de túbulos T y de RS (**Eisenberg, 1983**) y de isoformas de MHC rápida, tropomiosina (Tm) y troponina (Tn) (**Saltin & Gollnick, 1983**). Las fibras lentas tienen alta densidad de mitocondrias, son altamente oxidativas con baja capacidad glucolítica, tienen la mitad del contenido de túbulos T y RS y contienen las isoformas lentas de las proteínas contráctiles. El volumen de RS es 2 a 3 veces mayor en fibras rápidas (**Tomanek, 1976; van Winkle & Schwartz, 1978**). Estudios bioquímicos demostraron que el ritmo y capacidad de transportar Ca^{2+} , la actividad ATPásica Ca^{2+} dependiente, la formación de fosfoproteína, la actividad defosforilante y la concentración de una proteína bombeara de Ca^{2+} son más bajos

en RS de músculo lento (**Pette & Heilmann, 1979**). Membranas del RS de músculos rápido y lento difieren en la densidad de partículas de 7-9 nm que se observan en la cara cóncava de RS fracturado por congelación, es significativamente más bajo en músculo lento (**Bray & Rayns, 1976**); podría ser la ATPasa transportadora de Ca^{2+} (**Scales & Inesi, 1976**). Las características funcionales del músculo dependen del metabolismo, capacidad de manejo del Ca^{2+} y velocidad de hidrólisis de ATP. Las fibras I tienen una tasa lenta de actividad de mATPasa, lo cual reduce la demanda de energía. Esto, junto con su baja capacidad de manejo del Ca^{2+} , crea fibras con lento desarrollo de tensión pero muy resistentes a la fatiga (S). En el otro lado están fibras que tienen altas tasas de mATPasa y de manejo del Ca^{2+} pero bajas capacidades oxidativas. Estas fibras tienen rápida velocidad de desarrollo de tensión y relajación pero son rápidamente fatigables (FF). El esquema S, FR y FF se origina como un sistema para clasificar UM (**Burke, 1974**). Los músculos se caracterizan por su capacidad contráctil. En registros de sacudida única se mide fuerza, tiempo de contracción y relajación. La fuerza es pequeña en músculos lentos. Los tiempos de contracción y relajación son más breves en músculos rápidos. Los lentos tetanizan a frecuencias menores y desarrollan menor fuerza. Con un protocolo de fatiga (**Burke et al., 1973**) los músculos lentos mantienen la tensión, los rápidos la disminuyen, los lentos son resistentes a la fatiga, en cambio los rápidos son fatigables (Figura 1.6).

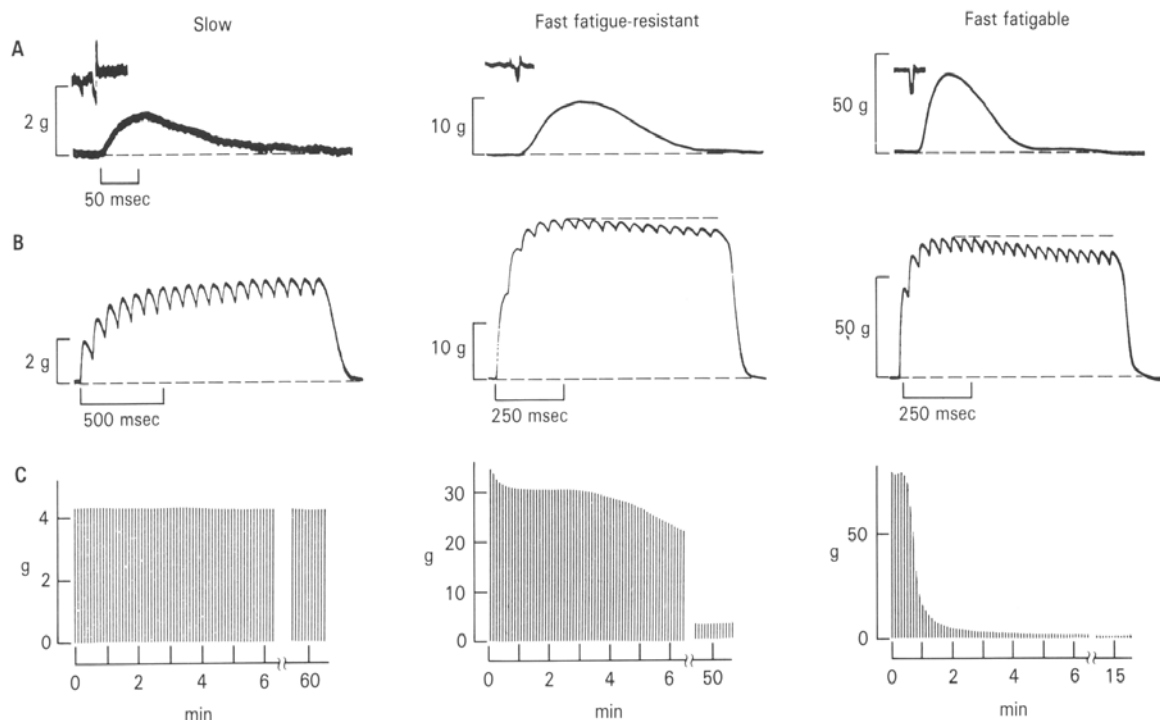


Figura 1.6.-Registros de UM tipo S, FR y FF aisladas tipo S, FR y FF. En A aumento de la tensión de sacudida y disminución del tiempo de contracción y relajación. En B aumento de tensión a 12 Hz. En C estímulo de 40 Hz, durante 330 mseg por segundo, para estudiar fatiga de UM. Las fibras de la UM tipo S mantienen la tensión por tiempo prolongado, las fibras de UM tipo FF se fatigan rápidamente (Burke et al., 1974b).

1. 6.-ADAPTACIONES DE LA UNIDAD MOTORA.

La evidencia sugiere que el tamaño de las motoneuronas α es influenciado por el desuso y el sobreuso del músculo esquelético. La tenotomía (Tomanek & Tipton, 1967) y la inmovilización de extremidad reduce el diámetro de las fibras nerviosas que inervan a estos músculos, mientras que la inmovilización de la extremidad contralateral (Eisen et al., 1973) y la denervación de músculos sinergistas tiene el efecto opuesto por el aumento de carga impuesto. Aunque el ejercicio es el método más natural para estudiar el efecto de la carga funcional sobre el músculo esquelético y el nervio, sus efectos sobre el tamaño de las fibras nerviosas está aún pobremente entendido. Se ha comunicado aumento, disminución o que no cambia el diámetro axonal, modificación del espesor de la vaina de mielina y del número total de fibras mielinizadas (Sammeck et al., 1981; Tomanek & Tipton, 1967; Key et al., 1984). Estos resultados son particularmente interesantes porque ponen en duda el concepto de la estabilidad metabólica de la mielina (Morell & Norton, 1978; Uzman & Hedley-White, 1968), y porque su incremento evidencia que la célula de Schwann puede responder a manipulaciones que alteran el espesor de la vaina de mielina (Saxod & Bouvert, 1981; Sharma et al., 1981). Las diferencias entre los distintos trabajos respecto de los efectos del ejercicio físico podrían deberse a protocolos de entrenamiento que difieren en duración, intensidad y frecuencia. También se ha sugerido que el crecimiento de los axones parece ser el factor que controla la tasa de formación de mielina por las células de Schwann (Friede, 1972 a, b). Las motoneuronas α responden a alteraciones crónicas de la actividad neuromuscular modificando sus propiedades. Las motoneuronas α de ratas sometidas a entrenamiento de resistencia muestran un aumento en el transporte axoplasmático de proteínas (Jasmin et al., 1988; Kang et al., 1995; Gharakhanlou et al., 1999), aumento en el contenido de enzimas mitocondriales de motoneuronas α que inervan el músculo sóleo (Suzuki et al., 1991), de sustancias tróficas como el péptido relacionado al gen de la calcitonina (Gharakhanlou et al., 1999) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (Gómez-Pinilla et al. 2001). Correlatos funcionales de estos cambios son desconocidos. Lo que al menos está claro es la magnitud a la cual las motoneuronas α se adaptan en sus propiedades fisiológicas a los cambios crónicos en la actividad neuromuscular. Por ejemplo, puesto que las propiedades electrofisiológicas de las motoneuronas α y las propiedades contráctiles e histoquímicas de las fibras musculares inervadas por ellas muestran un alto grado de covariación (Zengel et al. 1985; Gardiner, 1993), es razonable postular que cambios crónicos en la actividad que resulta en cambios en el músculo, podrían también alterar las propiedades de las motoneuronas α , para que esta covariación se mantenga. De hecho, el restablecimiento de las propiedades normales de la relación nervio-músculo parecen ocurrir a continuación de la reinervación del músculo por la regeneración de los axones motores (Foehring et al. 1986, 1987), así como también a continuación del corte del cordón espinal (Cope et al. 1986; Munson et al. 1986). Tales cambios pueden resultar de una actividad sináptica alterada del soma de la motoneurona α o por la influencia de

cantidades alteradas o tipos de factores tróficos secretados desde el músculo blanco (**Munson et al. 1997; González & Collins, 1997**), o por una combinación de estos factores.

Propiedades que distinguen tipos de motoneuronas α son dictadas más por los canales de conductancia iónica que por características morfológicas (**Binder et al. 1996**). Aunque se han comunicado plasticidad de conductancia neural, dependiente de actividades de corto y largo plazo (**Krawitz et al. 2001; Desai et al. 1999**) para varios tipos de neuronas en respuesta a varios modelos de actividad alterada, evidencia semejante no ha sido presentada para motoneuronas α sometidas a actividad neuromuscular voluntaria. El modelo más reciente, especialmente para ratas, es de particular interés en la perspectiva de cambios crónicos en las propiedades del músculo (**Lambert & Noakes, 1990; Seburn & Gardiner, 1995**) y de núcleos del SNC (**Dluzen et al. 1995; Neeper et al. 1995**), que pueden resultar de un aumento en la actividad motora espontánea. Recientemente se demostró que la carrera espontánea de ratas modifica propiedades electrofisiológicas de motoneuronas α que forman parte del nervio tibial. Las ratas corredoras tuvieron “motoneuronas lentas” con potencial de membrana en reposo y umbral de descarga más negativo, amplitudes de rebote más grandes y amplitudes más grandes de hiperpolarización, comparadas con motoneuronas lentas control. Estas adaptaciones no fueron evidentes en “motoneuronas rápidas”. Estos resultados sugieren adaptaciones en la densidad, localización y/o modulación de canales iónicos de membrana que controlan estas propiedades (**Beaumont & Gardiner, 2002**).

1. 7.-LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE BAJA FRECUENCIA (EBF).

La EBF significa activar un músculo mediante la estimulación preferentemente a 10 Hz de su nervio motor, usando electrodos implantados que son bien tolerados por el organismo animal (**Salmons & Jarvis, 1991**). La EBF al nervio motor de un músculo rápido induce conversión hacia el fenotipo lento. Esta transformación provee claves para descubrir mecanismos celulares que determinan el tipo de célula muscular y los efectos tróficos de la actividad neural. La duración de la estimulación es un importante hecho a considerar. Las transformaciones ocurren aproximadamente dos veces más rápido en músculos estimulados por 24 h/día que en los estimulados por 12 h/día. Hay diferencias en la respuesta de las células a la estimulación; se ha observado infiltración inflamatoria en el músculo estimulado en forma intermitente y no en aquellos estimulados de manera continua (**Lexell et al., 1992**). Aunque no es una perfecta reproducción del entrenamiento físico, la EBF es un modelo muy utilizado para estudiar eventos celulares que ocurren en el músculo esquelético en respuesta al ejercicio (**Booth & Thompson, 1991**). Las alteraciones del fenotipo son similares a aquellas que aparecen en respuesta al entrenamiento físico, son más rápidas, de mayor magnitud, ocurren en una secuencia ordenada, son reversibles, aumentan con la duración de la estimulación y son dosis dependiente. La EBF tiene ventajas sobre la actividad muscular voluntaria como modelo de efectos del entrenamiento físico. Con la estimulación de 24 h/día, es posible lograr toda la capacidad adaptativa y plástica del músculo esquelético, en cambio, es difícil alcanzar

una conversión completa del tipo de fibra en animales que realizan ejercicio, ya que están limitados por la fatiga y la motivación. Con la EBF, los efectos de la activación neural sobre el músculo está aislada de alteraciones en el sistema neuroendocrino que ocurren durante el ejercicio físico (liberación de catecolaminas, supresión de la liberación de insulina). Como la estimulación eléctrica es perfectamente controlable y los cambios ocurren rápidamente, los experimentos son más reproducibles. La EBF se realiza en una extremidad del animal, la extremidad contralateral se usa como control por posibles variaciones entre animales y de influencias ambientales (**Kraus et al, 1994**). La EBF presenta algunas desventajas como modelo de entrenamiento. Induce un tipo muy diferente de patrón de reclutamiento de UM, éstas son activadas sincrónicamente porque la estimulación es supramáxima, y no en forma graduada, forma jerárquica característica del movimiento voluntario. En muchos experimentos, el reclutamiento neuromuscular se realiza por un período mucho más largo, generalmente 8 a 24 h/día, que el que ocurre voluntariamente. Entonces la relación ejercicio-recuperación en la EBF y el porcentaje del período de 24 horas de trabajo contráctil realizado es muy diferente. Se hacen varias suposiciones cuando se usa la EBF. Se supone que la presencia del aparato estimulador y la estimulación propiamente tal no causa ninguna asimetría postural o locomotora. Esta suposición parece válida en aquellas observaciones hechas en la extremidad control donde no varía debido a lo prolongado de la estimulación (**Brown et al., 1989; Eisenberg & Salmons, 1981**), mediciones en la extremidad contralateral son similares a las de extremidad de animales sin tratamiento (**Pette et al., 1975**).

1. 8.-EFECTOS DE LA EBF SOBRE EL MUSCULO ESQUELÉTICO.

1.8.1.-Adaptaciones macroscópicas.

El músculo rápido se torna más rojo lo que se debe a un incremento en la densidad capilar (Figura 1.7 y 1.8) (**Hudlická et al., 1982a**) y a incremento en el contenido de mioglobina. Disminuye el área de sección transversal de la fibra y aumenta el tejido conectivo endomisial (**Eisenberg & Salmons, 1981**). No hay una pérdida importante de fibras, así la atrofia se debe a disminución en el área de fibra y no al número de fibras (**Pette et al., 1976**).

Figura 1.7.-Disposición y recorrido de vasos capilares rodeando fibras musculares.

La técnica consiste en inyectar vía arteria un plástico que al polimerizar deja el molde, luego mediante un tratamiento ácido se destruyen las fibras musculares y con lavados sucesivos se retiran los restos. Se nota claramente los lugares que ocupaban las fibras musculares.

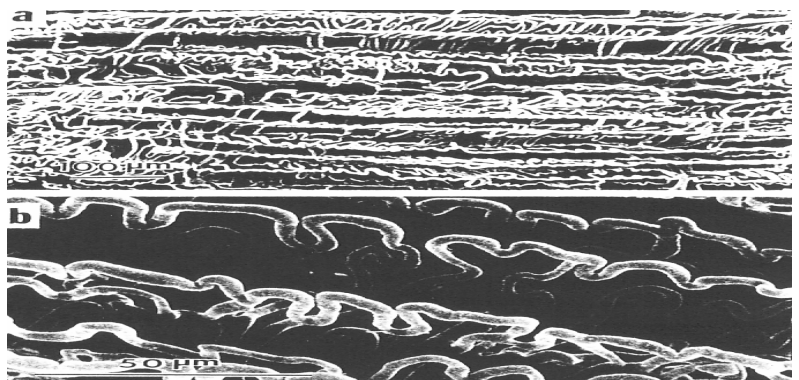
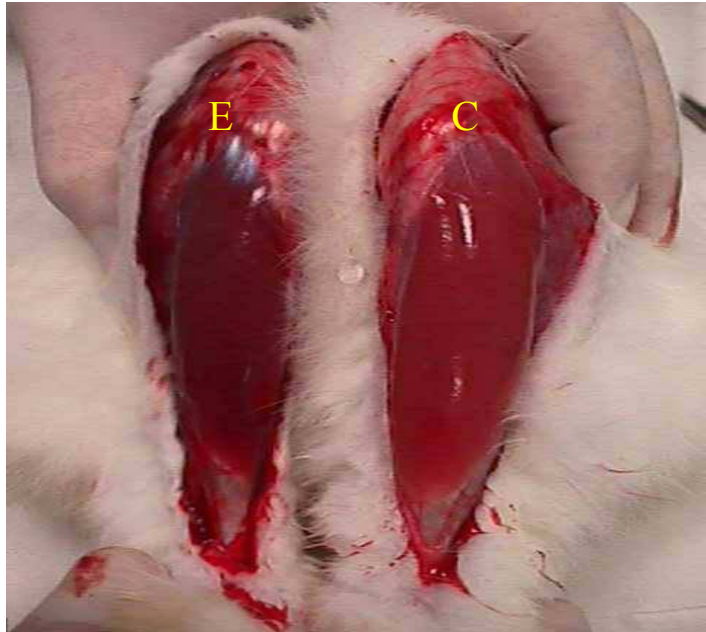


Figura 1.8.-Se observa el color más rojo de un músculo tibial anterior estimulado a 10 Hz durante 24 horas (E), la extremidad contralateral muestra el músculo control (C).



1.8.2.-Adaptaciones ultraestructurales.

Después de unas pocas horas de EBF, se produce hinchamiento de los túbulos del RS longitudinal; dentro de la primera semana, hay una disminución en las cisternas terminales del RS y hacia las dos semanas de estimulación, este sistema alcanza los niveles típicos del músculo lento, por lo tanto se reduce la cantidad y composición de membrana que funciona transportando Ca^{2+} (Eisenberg et al., 1984; Eisenberg & Salmons, 1981) (Figura 1.9).

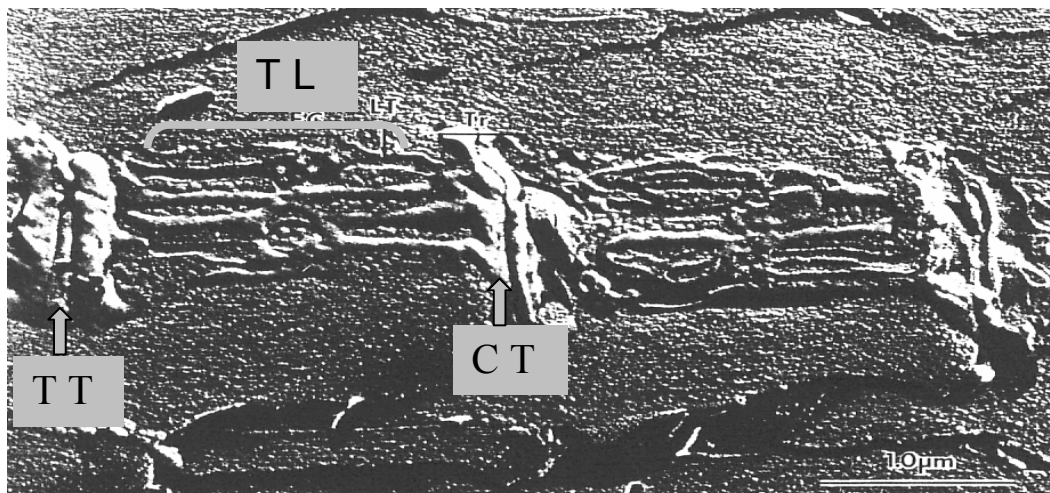


Figura 1.9.-En la criofractura de RS se observan cisternas terminales (CT) y túbulos longitudinales (TL) de RS.

Entre cisternas terminales se observa túbulo T (TT).

Cambios ultraestructurales en vesículas de RS mediante estudio con criofractura, muestra disminución de partículas intramembranas de la cara cóncava y aumento en la cara convexa. La asimetría de la membrana está reducida. Cambios en la densidad de partículas de la cara cóncava están restringidas a partículas de 7-9 nm lo que se correlaciona con la disminución de la actividad de ATPasa transportadora de Ca^{2+} de 115 kD, como también con una disminución en la captación inicial y máxima de Ca^{2+} (**Heilmann et al., 1981**). Con el tiempo disminuye la cantidad de túbulos T y llega a ser indistinguible del sistema tubular T de músculo sóleo (**Eisenberg et al., 1984**). Durante las primeras semanas las miofibrillas muestran aumento del ancho de la banda Z (**Maier et al., 1988**) (Figura 1.10).

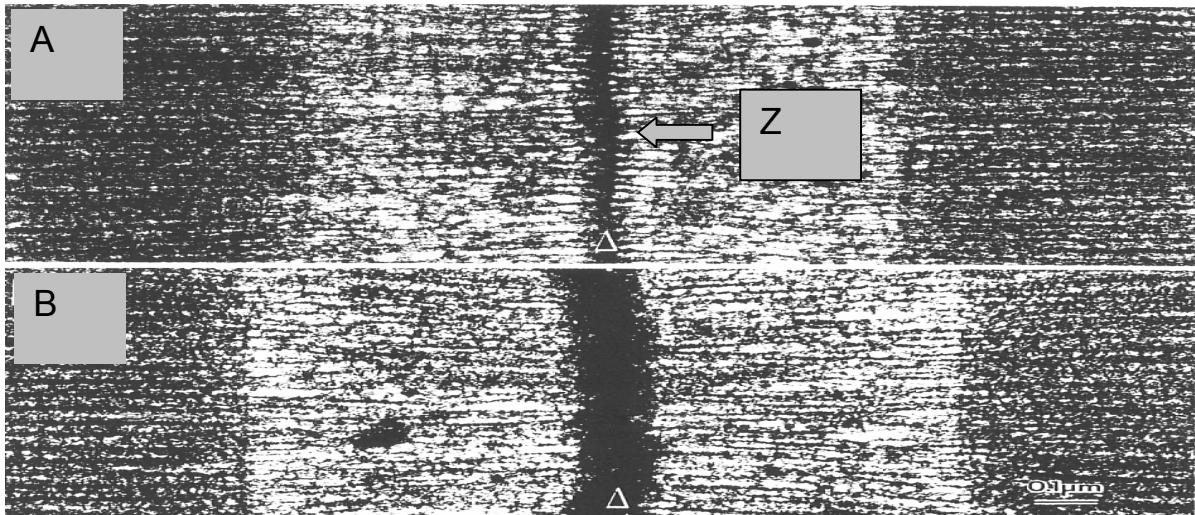
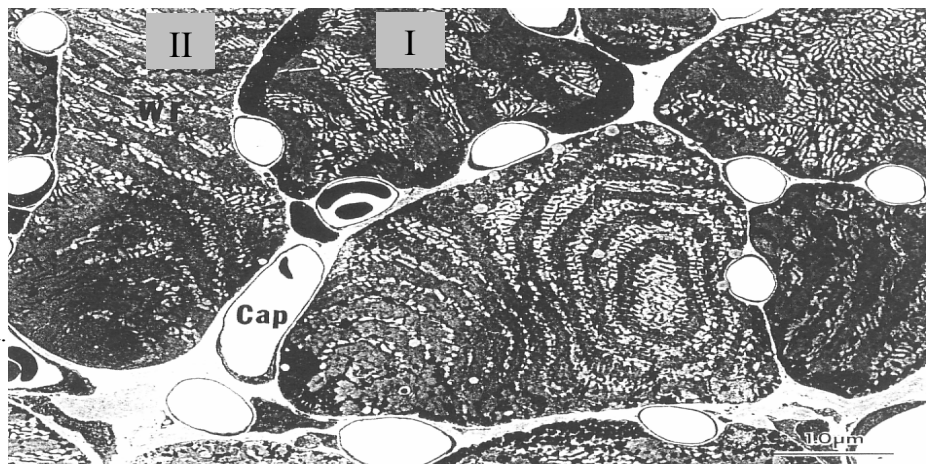


Figura 1.10.-Vista parcial de una sarcómera a nivel de banda I. En A ancho de línea Z de fibra muscular rápida control, en B aumento del ancho de la línea Z por efecto de estimulación a 10 Hz.

Aumenta el número de mitocondrias, tal que su contenido alcanza niveles de tres veces el del músculo sóleo (**Eisenberg et al., 1984; Reichmann et al., 1985**) y aumenta el área de membrana mitocondrial interna (**Pette et al., 1975**) (Figura 1.11).

Figura 1.11.-Perfiles de fibras tipo I y II, zonas negras indican mitocondrias, abundantes en fibras tipo I especialmente en la zona periférica bajo el sarcolema.



La estimulación induce aumento de cardioplipina, un fosfolípido de la membrana mitocondrial interna, antes de aumentar las enzimas mitocondriales; esto sugiere que el ensamblaje de nuevas mitocondrias parte con la síntesis de la bicapa lipídica, seguido de la inserción de proteínas (**Takahashi & Hood, 1993**). Después de siete semanas, hay una rápida disminución de la densidad del volumen mitocondrial, aunque aun permanece por sobre el del sóleo; aumenta el número de núcleos por unidad de volumen, esto da como resultado una disminución del volumen de sarcoplasma manejado por núcleo; el aparato de Golgi está aumentado (**Eisenberg & Salmons, 1981**) y aumentan ribosomas y polirribosomas (**Joplin et al., 1987**). Aumenta la cantidad de células satélite; detectado en EDL y tibial anterior de conejo, donde la EBF provoca daño de fibras FG (**Maier et al., 1986**). Aunque hay un significativo aumento en la cantidad de células satélite, no hay signos de degeneración (**Delp & Pette, 1994**); parece, por lo tanto, que el aumento de células satélite ocurre independientemente de la reparación de fibra y regeneración (Figura 1.12).

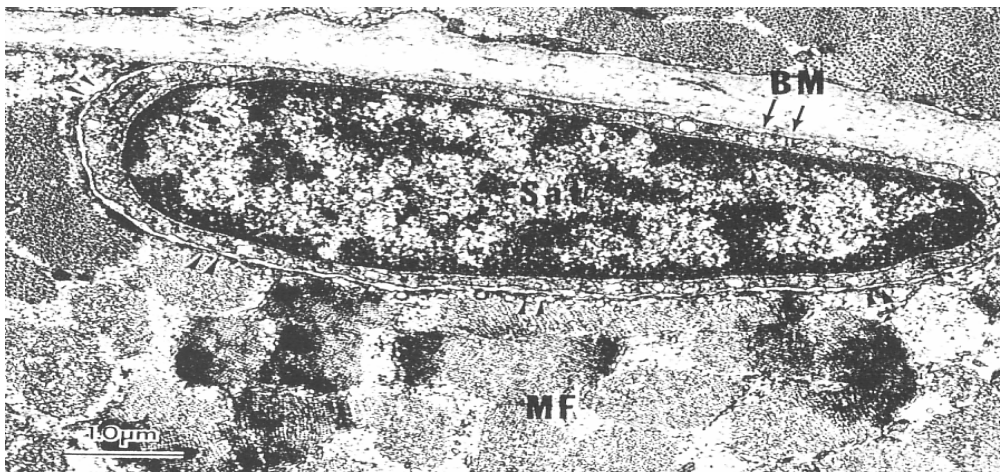


Figura 1.12.-En la fotografía se observa una célula satélite ubicada en concavidad sobre una célula muscular. Presenta un citoplasma escaso y el núcleo es alargado. Se observa la separación entre las membranas celulares (puntas flecha). BM es membrana basal, Sat es célula satélite, MF es miofibrillas.

1.8.3.-Adaptaciones moleculares.

Una gran proporción de los miotubos recientemente formados cambian desde MHCemb a miosina lenta (**Schuler & Pette, 1996**). Hay cambios en la composición de proteína miofibrilar, a nivel de miosina hay múltiples pasos en la transición rápido a lento por cambios secuenciales de las isoformas de MHC. En el tibial anterior de conejo, esta secuencia de transición sigue el orden MHCII_{d/x} → MHCII_a → MHCII_β (**Staron et al., 1987; Leeuw & Pette, 1993**). El desmoronamiento inicial de MHCII_{d/x} ocurre con una vida media de 13 días. Una isoforma de MHC parecida a la α cardíaca (MHCII_α) está involucrada en la transición MHCII_a → MHCII_β en el músculo de conejo sometido a EBF, sugiriendo que MHCII_α es un paso intermedio (**Peuker & Pette,**

1995). En músculos de conejo sometidos a EBF, se modifica la dotación de MLC; el reemplazo de las cadenas livianas rápidas con su contraparte lenta no ocurre en forma sincrónica (Leeuw & Pette, 1996). Estudios bioquímicos (Pette & Schnez, 1997) así como inmunohistoquímicos (Rubinstein et al., 1978) demostraron la coexistencia de isoformas de cadenas livianas rápidas y lentas dentro de fibras aisladas de músculos en transformación.

Ocurren profundos cambios en el sistema regulador del calcio. Un cambio es la transformación de la isoforma rápida SERCA1a a la isoforma lenta SERCA2a de la Ca^{2+} -ATPasa de RS (Hu et al., 1995). Este cambio de isoforma está acompañada por una pronunciada disminución en la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa, algo de la cual se debe a la transición de la isoforma y algo a partir de la inactivación parcial de la enzima (Matsushita & Pette, 1992). Calsecustrina sólo está ligeramente reducida y los receptores de DHPR de túbulos T y los de RyR de RS están muy reducidos (Ohlendieck et al., 1991) (Figura 1.13).

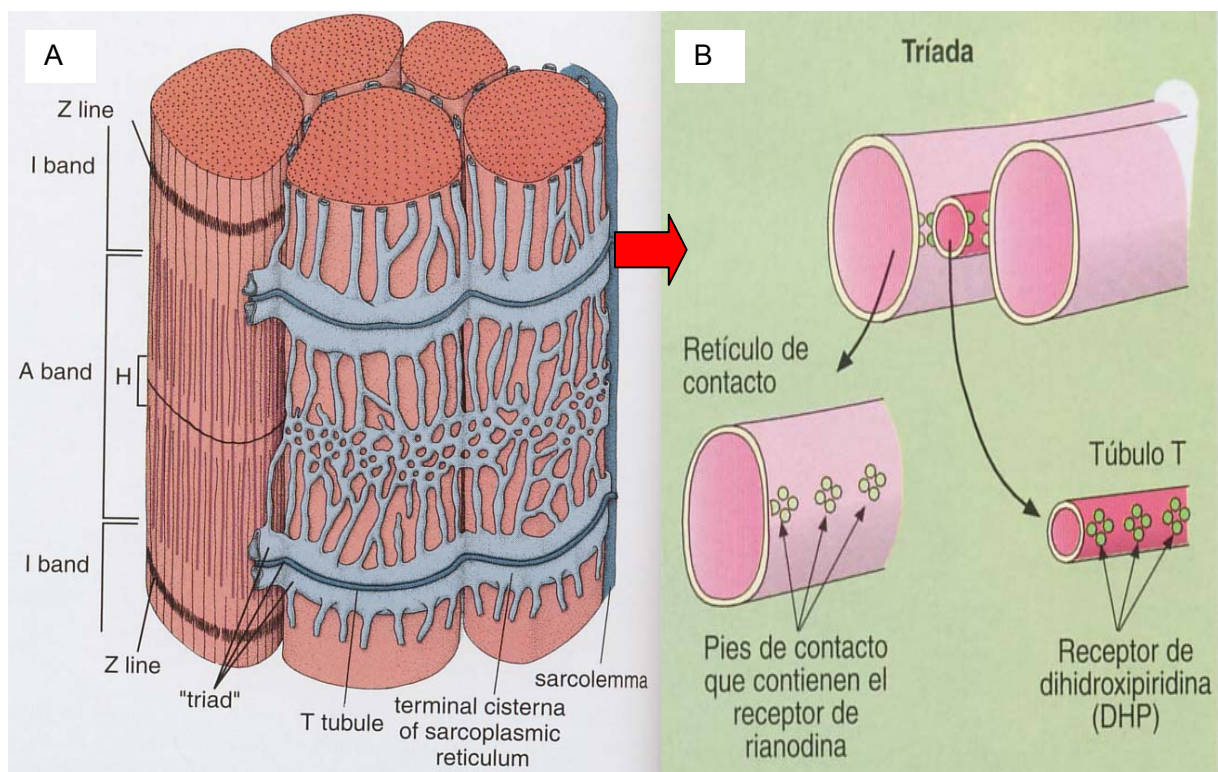


Figura 1.13.-En A se muestra un esquema de miofibrillas rodeadas por RS. En B una ampliación de la triada en donde se muestra la ubicación de los receptores de dihidropiridina en los túbulos T y los pies de contacto de los receptores de rianodina en las cisternas terminales de RS.

Otro marcado cambio del sistema regulador del calcio inducido por la estimulación consiste en la inducción de fosfolamban, el cual normalmente no se expresa en el músculo de contracción rápida. Se demostró que la expresión coordinada de las proteínas SERCA2a y fosfolamban en la transformación del músculo

latissimus dorsi de perro se produce primariamente por control translacional para SERCA2a y control transcripcional del gen de fosfolamban (Hu et al., 1995). Parvalbúmina, que normalmente no se expresa en el músculo de contracción lenta, está suprimida en el músculo de contracción rápida de conejo y rata por la EBF (Huber & Pette, 1996).

1.8.4.-Adaptaciones metabólicas.

La EBF de un músculo rápido con un patrón similar al de uno lento resulta en una secuencia ordenada de cambios que afectan a todos los elementos funcionales de las fibras musculares: actividad enzimática y patrones de isoenzimas del metabolismo energético, elementos del sistema regulador del calcio, proteínas contráctiles y reguladoras del aparato miofibrilar (Pette & Vrbová, 1992). Los cambios en el metabolismo energético consiste en un incremento de varias veces en los niveles de actividad de enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo aeróbico, oxidación de ácidos grasos, utilización de cuerpos cetónicos y oxidación de aminoácidos. Estas alteraciones ocurren en paralelo con disminuciones en la actividad de enzimas representantes de vías anaeróbicas de la utilización del glucógeno y glucosa, glucogenólisis y glucólisis. Una excepción de lo último es un marcado aumento en la capacidad de fosforilación de la glucosa debido a la elevación en varias veces en la cantidad de hexokinasa (Parra & Pette, 1995). Existen diferencias notables con diferentes especies animales respecto del grado de alteraciones en el patrón de actividad enzimática del metabolismo oxidativo. Protocolos idénticos de EBF aplicados al músculo tibial anterior de ratón, rata, guinea pig y conejo, dan como resultado adaptaciones específicas de la especie. Las elevaciones en las actividades de enzimas del metabolismo aeróbico oxidativo son altas en conejo, bajas en ratón e intermedias en rata. Estos aumentos están inversamente relacionados a los niveles basales de estas enzimas en músculos no estimulados (Simoneau & Pette, 1988).

Alteraciones en la concentración de metabolitos se han observado ya durante los primeros minutos de estimulación hasta horas después del inicio de la estimulación (Green et al., 1991; Green et al., 1992a). Ocurre una marcada disminución de PCr, aumentos en la creatina, ADP, AMP y fosfato libre, una drástica disminución del potencial de fosforilación del sistema adenilato y un rápido agotamiento del glucógeno, concomitante con un pronunciado y transitorio aumento del lactato y una elevación de la glucosa libre. Sucesivos aumentos en las concentraciones de Glc1,6P₂ y Fru2,6P₂ alcanzan un máximo entre las 12 y 24 h (Green et al., 1991). Muchos de estos cambios son transitorios y signos de recuperación metabólica ya se hacen detectables después de un período de estimulación que excede las 2 h. La recuperación del nivel de metabolitos consiste en progresivos aumentos del glucógeno y PCr, así como disminuciones en ADP, AMP y fosfato libre. Por ejemplo, la PCr, que estaba reducida un 60 % después de 15 min, alcanza valores cercanos al control después de 24 h con estimulación continuada. La concentración de glucógeno, que estaba reducida un 90 % después de 1 h, alcanza el 60 % de su valor normal por el mismo tiempo. Estos y otros eventos tempranos de la recuperación metabólica

sugieren respuestas metabólicas adaptativas presentes ya durante las primeras horas de la EBF. La EBF por 5 min reduce los fosfatos ricos en energía y el glucógeno y aumenta el lactato en músculo tibial anterior control de conejo. Por otra parte, músculos preestimulados por 24 h muestran valores cercanos al normal para el ATP, PCr y glucógeno, y no aumenta el lactato. La tensión isométrica del músculo control disminuye rápidamente unos pocos minutos después del inicio de la estimulación; en músculos preestimulados la tensión fue casi estable, pero equivalió sólo al 30-40 % de la tensión inicial del músculo control. Se sugiere que en vista de la distribución del tipo de fibra del músculo tibial anterior de conejo, una gran fracción de fibra del músculo preestimulado, posiblemente fibras IID no se contraen. Por consiguiente, la posibilidad que debe ser considerada es que el patrón de metabolitos del músculo estimulado 24 h refleja primariamente actividades metabólicas de la contracción de fibras menos fatigables, más probablemente fibras del tipo IIA y I. La sugerencia que una gran fracción de fibras no produce fuerza, a pesar de la recuperación metabólica, apunta a factores responsables de su refractariedad a la EBF distintos del agotamiento metabólico (Cadefau et al., 1993). La causa de la refractariedad podría estar en cualquier sitio del proceso de acoplamiento excitación-contracción, por ejemplo, bloqueo de depolarización inducida por K^+ debido a una insuficiente capacidad $Na^+-K^+-ATPasa$ a lo largo del sarcolema y/o del túbulo T, disminución de la sensibilidad a voltaje del receptor de DHPR, disminución de la liberación de Ca^{2+} por el receptor de RyR, y/o cambios en otros componentes reguladores, así como una disminución en la captación del Ca^{2+} y retención del Ca^{2+} (Hicks et al., 1997). Con estimulación continua, muchas de las perturbaciones metabólicas se recuperan después de 1 día, mientras que la reducción en la generación de fuerza persiste y sólo se recupera gradualmente a los 8-10 días (Green & Pette, 1997). Parece improbable, por tanto, que el agotamiento metabólico sea responsable de la persistente baja fuerza generada, y de este modo es posible que un deterioro del proceso de acoplamiento excitación-contracción este causalmente relacionado a la prolongada depresión de la fuerza. Mediciones de EMG podrían ayudar a delinear dónde se encuentra el sitio de fallo. Por ejemplo, si el fallo se debe a bloqueo de la propagación del potencial de acción, la disminución de la fuerza podría estar acompañada por una disminución de la actividad EMG (Edwards et al., 1977a, b). Si, sin embargo, el sitio de fallo está más allá de los procesos de acoplamiento excitación-contracción, la fuerza podría declinar, pero la actividad EMG permanecería relativamente normal.

1.8.5.-Adaptaciones contráctiles.

Como resultado de la EBF, el músculo rápido se convierte hacia uno de contracción lenta. Cambios en las características de la contracción isométrica llegan a ser significativos 2 semanas después de la estimulación, mientras que cambios en la contracción isotónica ocurren más tardíamente. Esto sugiere que el sistema captador de calcio y las propiedades metabólicas se alteran tempranamente, pero los cambios miofibrilares ocurren después de períodos largos de estimulación. La estimulación continua se manifiesta en una disminución de la

fatiga, aumento del tiempo de contracción y de media relajación, así como una disminución de la máxima tensión de tétano. En particular, la contracción tetánica máxima, se mide en condiciones que activan totalmente el músculo, de manera que la disminución presumiblemente refleja cambios en la cinética de la interacción de los puentes cruzados de miosina, lo que resulta de la transición de isoformas de miosina rápida a lenta (**Salmons, 1990**). Sin embargo, los cambios en las propiedades contráctiles inducidos por estimulación también se reflejan en alteraciones en la composición de otras proteínas miofibrilares, incluyendo las proteínas reguladoras de actina (troponina, tropomiosina). Dentro de los primeros 5 min de EBF hay una rápida pérdida de fuerza y una declinación gradual en las pocas horas siguientes (**Green et al., 1992a; Mayne et al., 1991**). En el siguiente primer día de 12 h/día de estimulación disminuye la tensión y aumenta el tiempo de media relajación, estas alteraciones indican fatiga y pueden representar un deterioro en el manejo del calcio (**Klug et al., 1988**), el hinchamiento del RS es evidente (**Eisenberg & Salmons, 1981**). La continuación de la estimulación lleva a un aumento en el tiempo de contracción y de media relajación (**Simoneau et al., 1989**). Estos cambios han sido observados después de sólo 1 a 4 días de estimulación (**Klug et al., 1988**). El aumento del tiempo de contracción podría deberse a una disminución en la velocidad de acortamiento, así como a una prolongación del estado activo. Estos factores han sido distinguidos examinando la tensión producida durante una contracción, relativa a la producida durante tétano máximo (contracción/tétano). Aunque hay una disminución inicial en la tensión de la contracción, después de 5 a 10 días de 12 h/día de estimulación se normaliza, pero con la continuación de la estimulación, aumenta sin parar a través de 21 días. Este aumento es acompañado por una disminución en la máxima tensión de tétano. La consecuencia de estas alteraciones es un aumento en el cociente contracción/tétano (**Klug et al., 1988; Simoneau et al., 1989**). Esto indica que la duración del estado activo durante una contracción está prolongado. Esto es, una mayor proporción de la tensión de tétano se produce durante una contracción única (**Klug et al., 1988**). Por lo tanto, el aumento del tiempo de contracción y de media relajación se deben, al menos parcialmente, a una prolongación del estado activo, lo cual sugiere que están involucradas alteraciones en el manejo del calcio. En particular, parece haber una reducida capacidad para la captación del calcio por el RS, además de una disminución en la amortiguación del calcio citosólico, secundaria a una disminución en el contenido de parvalbúmina (**Eisenberg & Salmons, 1981; Klug et al., 1988; Simoneau et al., 1989**). El aumento del tiempo de contracción se debe además a cambios en las isoformas de miosina (**Sweeney et al., 1986**). La disminución en la máxima tensión de tétano está muy correlacionado con la masa muscular y el área de sección transversal del músculo (**Brown et al., 1989**). Al nivel de la fibra, la fuerza por área de sección transversal no está alterada después de la estimulación (**Sweeney et al., 1986**). Estos hallazgos indican que la tensión específica no está alterada. Ello sugiere que se mantiene la arquitectura interna del músculo transformado (orientación y largo de las fibras, densidad del tejido). Estos resultados dan a entender que una proporción constante de área del músculo está involucrada en la generación de tensión, y de este modo los cambios en los elementos no contráctiles tales como mitocondrias y núcleo no alteran la tensión específica

(**Brown et al., 1989**). Los músculos estimulados muestran un aumento en la resistencia a la fatiga (**Brown et al., 1989; Hudlická et al., 1982b**). El cambio se observa dentro de pocos días después del inicio de la EBF (**Simoneau et al., 1993**) y se debe en parte a la transición de proteína contráctil de rápida a lenta, lo cual resulta en una enlentecida tasa de agarre de los puentes cruzados y de este modo el costo energético es muy bajo (**Brown et al., 1989**). Los determinantes iniciales parecen ser los aumentos en la densidad capilar y en la capacidad oxidativa (**Brown et al., 1989; Pette & Vrbová, 1992**). De éstos, el aumento de la densidad capilar parece ser la más importante. Esto es, cambios en la resistencia a la fatiga y densidad capilar ocurren dentro de la primera semana, mientras que hay un retardo antes del aumento en las enzimas oxidativas (**Simoneau et al., 1993**). Además, el aumento en las enzimas oxidativas no está acompañado por un nuevo mejoramiento en la resistencia a la fatiga (**Simoneau et al., 1993**). Por último, hay un enlentecimiento de la velocidad máxima que se correlaciona con el contenido de isoformas de miosina (**Sweeney et al., 1986**).

1. 9.-FATIGA MUSCULAR.

La fatiga muscular se suele definir como “un menor desarrollo de fuerza que la esperada a consecuencia de un trabajo muscular exhaustivo”, en esta definición se excluye pérdidas de fuerza debida a daño o a factores que no están relacionados directamente a la activación del músculo. Se ha propuesto que la inhibición del desarrollo de fuerza puede ocurrir en casi todos los pasos de la activación, estimulación, contracción y relajación (**Edwards, 1982**). Un aspecto clave de la fatiga es que el músculo esquelético comúnmente opera a intensidades metabólicas que están lejos de niveles sustentables. Así, la fatiga que resulta de la actividad del músculo sirve como mecanismo de inhibición de la actividad muscular y que tiende a mantener la homeostasis intracelular. La fatiga ocurre en varias etapas a lo largo de la activación-relajación del músculo (**Baker et al., 1993; Kent-Braun et al., 1993**). Un ejemplo de modelo de componentes múltiples es el usado por Chance para estudiar el control del metabolismo oxidativo (**Chance et al., 1986**). Una parte de la investigación sobre fatiga muscular se ha enfocado a la cinética del calcio y al acoplamiento excitación-contracción como localización primaria de la fatiga muscular. Recientemente, la interacción de subproductos metabólicos (fosfato) y el calcio se ha sugerido como un mecanismo para la fatiga (**Kabbara & Allen, 1999**).

Se piensa que la fatiga metabólica se debe a la inhibición de la formación de puentes cruzados de miosina secundaria a un cambio en el estado de energía libre del músculo o al nivel intracelular de metabolitos (**Nosek et al., 1987**). La aproximación in vitro usa preparaciones de fibras intactas o desolladas y se mide la fuerza y velocidad del músculo activado en presencia de concentraciones conocidas de fosfato inorgánico, H^+ y ADP. Sin embargo, el ADP no parece ser un causante potencial de fatiga metabólica en concentraciones fisiológicas (**Cooke and Pate, 1985; Kentish, 1986**). Por otra parte, estudios in vitro han mostrado que aumentos en el fosfato inorgánico e H^+ disminuyen el desarrollo de fuerza de fibras desolladas (**Cooke and**

Pate, 1985). Se cree que el fosfato inorgánico inhibe la transición desde un estado de pre-golpe de fuerza actina*miosina*ADP*P_i a la fuerza producida por el estado actina*miosina*P_i (**Chinn et al., 2000**). Los efectos del H⁺ son polémicos, con alguna evidencia de que el aumento del H⁺ deprime la fuerza, reduce la velocidad y mejora la economía (**Myburgh & Cooke, 1997**). Hay sugerencias de un efecto interactivo del fosfato inorgánico y del H⁺, sin embargo, estudios recientes han cuestionado el papel del pH en la fatiga metabólica. Muchos de los estudios previos que han mostrado una fuerte evidencia del efecto del pH en la fatiga han sido realizados a temperaturas relativamente bajas (< 15°C). Sin embargo, temperaturas que se acercan a las fisiológicas (30°C) muestran mucho menos de un efecto inhibitorio del pH (**Dibold & Fitts, 2000; Pate et al., 1995**). Por ejemplo, la influencia de un pH bajo sobre el desarrollo de fuerza va desde un 50 % a 10°C hasta un 18 % a 30°C (**Pate et al., 1995**). Evidencia de que productos metabólicos están asociados con fatiga también ha sido encontrada in vivo. Estudios en humanos han encontrado que la fatiga muscular se correlaciona muy bien con cambios en fosfato inorgánico protonado, sugiriendo una interacción del efecto del P_i y pH (**Miller et al., 1987; Wilson et al., 1988**). En apoyo a la fatiga metabólica, la cinética de la fatiga muscular y cambios en fosfato inorgánico protonado son a menudo similares. Se encontró coeficientes de correlación de ~ 0,9 para el pH y H₂PO₄ y la fuerza (**Wilson et al., 1988**). Hay evidencia de que la fatiga metabólica puede ocurrir vía diferentes mecanismos. Uno es que la depleción de sustratos metabólicos puede producir fatiga. La depleción de glucógeno muscular (**Weltan et al., 1998**) e intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (**Spencer et al., 1991**) se sugieren como mecanismos para causar fatiga muscular por reducción del metabolismo oxidativo del músculo. Este potencial mecanismo es especulativo y hay alguna evidencia que la reducción de intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico no está reducido durante el ejercicio después de la depleción de glucógeno, una condición en donde se podría esperar que la depleción metabólica sea importante (**Gibala et al., 1999**). La depleción de sustratos debe tener muy diferentes características de fatiga comparada con la acumulación de productos metabólicos, como un comienzo y recuperación mucho más lento. Otro mecanismo para fatiga metabólica es que los productos metabólicos puedan reducir la liberación de calcio desde el RS (**Kabbara & Allen, 1999**). Por ejemplo, altos niveles de fosfato inorgánico pueden precipitar con el calcio y reducir los niveles de calcio libre (**Fryer et al., 1995**). Los metabolitos también pueden inhibir la captación de calcio por el RS. Uno de los métodos usados para identificar la fatiga del acoplamiento excitación-contracción es hacer uso de la relación frecuencia-fuerza. La reducida liberación de calcio con cada potencial de acción debe tener un efecto relativamente mayor sobre la fuerza con EBF que con EAF. La EAF puede producir saturación de los niveles de calcio aún si la cantidad de calcio liberado por cada potencial de acción está reducido. La relativamente más baja fuerza con EBF se denomina “fatiga de baja frecuencia”. Aún cuando el comienzo de la fatiga puede ser bastante rápido, una vez que el calcio ha sido secuestrado, para este calcio puede tomar horas retornar al conjunto del calcio libre (**Edwards et al., 1977a, b**). Estudios posteriores sugieren que metabolitos pueden aumentar la cantidad de fatiga del acoplamiento excitación-contracción (**McCully et al., 2002**).

1.9.1.-Fatiga de alta y baja frecuencia (FAF y FBF).

Un fracaso del acoplamiento excitación-contracción es reconocido como una de las posibles causas de fatiga en el músculo esquelético, pero la falla del acoplamiento excitación-contracción no es una sola entidad. La fatiga puede ser causada por una falla en la propagación del potencial de acción por el sarcolema y sistema tubular T, una falla de los mecanismos de acoplamiento entre el potencial de acción y la liberación de Ca^{2+} , o una falla de la regulación del Ca^{2+} a nivel de los elementos contráctiles.

Hay dos tipos de falla del acoplamiento excitación-contracción, uno de ellos resulta en una preferencial pérdida de fuerza a alta frecuencia de estimulación (fatiga de alta frecuencia, FAF) y el otro que afecta el desarrollo de fuerza a baja frecuencia de estimulación (fatiga de baja frecuencia, FBF).

1.9.2.-Fatiga de alta frecuencia (FAF).

Pra estudiar la fatiga muscular de manera objetiva se desarrollaron métodos de estimulación eléctrica (**Edwards et al., 1977a, b**). Entonces una paradoja se hizo aparente: para obtener la máxima fuerza muscular fue necesario estimular a alrededor de 50 Hz, pero para obtener la máxima duración de la contracción fue necesario reducir la frecuencia a alrededor de 20 Hz. Quedó claro que la tasa de fatiga era dependiente de la frecuencia de estimulación e investigaciones posteriores de las respuestas mecánica y eléctrica a diferentes frecuencias de estimulación (**Jones & Bigland-Ritchie, 1986**) llevaron al reconocimiento de las siguientes características de la FAF: 1.-La pérdida de fuerza después de estimular a alta frecuencia se reducía rápidamente reduciendo la frecuencia de estimulación. 2.-La pérdida de fuerza está acompañada por una disminución de amplitud y enlentecimiento del potencial de acción muscular. 3.-La pérdida de fuerza está aumentada si disminuye la $[\text{Na}^+]$ extracelular o aumenta la $[\text{K}^+]$. Estas características son consistentes con el K^+ liberado desde el músculo, acumulándose en los espacios extracelulares e impidiendo la propagación del potencial de acción por las membranas celulares. El enlentecimiento de la onda y la pérdida de amplitud del potencial de acción indican que la conducción por la membrana está afectada durante la FAF, ya que el grueso de los eventos eléctricos del potencial de acción muscular es dominado por la superficie, en lugar de los túbulos T. Si la de $[\text{K}^+]$ extracelular está suficientemente elevada para impedir la conducción por la membrana, entonces es casi cierto que la conducción por los túbulos T estaría bloqueada por aumento de la $[\text{K}^+]$ extracelular la que sería mayor dentro del lumen del tubo T que tiene un volumen pequeño, gran área de superficie y pobre difusión. La confirmación que este tipo de mecanismo puede ocurrir durante la estimulación prolongada de alta frecuencia proviene de observaciones de gradientes de Ca^{2+} dentro de las fibras (**Westerblad et al., 1990**), que indican una falta de activación de las regiones centrales de la fibra muscular debido a una falla de la propagación hacia el interior de

la fibra del potencial de acción. Lo que es cuestionable del modelo es si es un mecanismo normal de fatiga, se sugiere que la FAF no es factor importante en la actividad normal.

Recientemente se ha observado que la pérdida de desempeño del músculo tibial anterior humano cuando se estimula a 30 Hz, cercana a la frecuencia natural, tiene características de la FAF cuando se estimula a un largo muscular corto (**Sacco et al., 1994**). El ángulo del tobillo se ajustó para que el tibial anterior se mantuviera a su longitud óptima o en una posición acortada, con el tobillo en cerca de 80° de flexión plantar. Los músculos fueron estimulados bajo condiciones isquémicas a estos dos largos y por cerca de 30 s fue claro que el músculo acortado tuvo un mayor grado de fatiga que el músculo mantenido en su largo óptimo. Cuando los músculos se mantuvieron a su largo óptimo pero fueron estimulados a diferentes frecuencias, se observó que el efecto de la estimulación del músculo acortado a 30 Hz fue similar a estimular el músculo a un largo normal pero a una frecuencia 60 Hz. Se permitió que los músculos se recuperaran bajo condiciones isquémicas después de la estimulación, y a longitudes cortas como óptimo hubo una recuperación sustancial sobre los 120 s. La recuperación fue más evidente en el músculo estimulado a un largo corto, y cuando el músculo acortado retornó a su largo óptimo, aún bajo condiciones isquémicas, hubo además una recuperación de la fuerza. Después de estimular el músculo a diferentes frecuencias pero a su largo óptimo, la recuperación fue más pronunciada después de fatigar a altas frecuencias de 60 Hz de nuevo, comportamiento similar a aquel del músculo estimulado a 30 Hz pero a un largo menor.

Los resultados obtenidos con el músculo acortado fueron consistentes con el movimiento del K^+ restringido al lumen de los túbulos T, posiblemente porque la apertura de la superficie de la fibra estaba estrechada. El alargamiento del músculo pudo haber removido esta restricción y permitir la difusión del K^+ afuera de los túbulos T y así recuperar la función. Una falla en la propagación del potencial de acción a largos menores del músculo también fue sugerido por otros autores (**Taylor & Rüdell, 1970**). No está claro por qué aumentos de $[K^+]_{\text{extracelular}}$ lleva a tan dramática pérdida de fuerza. Una elevación de $[K^+]_{\text{extracelular}}$ podría llevar a una reducción en el potencial de membrana en reposo, producida cerca del umbral de iniciación de un potencial de acción y de este modo haciéndolo más excitable; pero claramente esto no ocurre. La activación total de un músculo aislado estimulado puede ser alcanzada variando la duración y voltaje de los estímulos, manipulando la corriente que fluye a través del músculo.

Hay poca evidencia de que la FAF sea una importante causa de fatiga en músculo normal. Sin embargo, debe reconocerse que el músculo tiene mecanismos para neutralizar la acumulación de K^+ , como el control de la frecuencia de descarga de la UM, la presencia de un sistema de perfusión y mecanismos para aumentar el número y actividad de bombas $Na^+ - K^+$ (**McComas et al., 1993; Clausen & Nielsen, 1994**). Por lo tanto, se puede concluir que para la FAF el potencial es muy importante.

1.9.3.-Fatiga de baja frecuencia (FBF).

La determinación de la relación fuerza-frecuencia es un camino conveniente para caracterizar las propiedades contráctiles de un músculo, ya que el desplazamiento de la relación en la gráfica a la izquierda cuando el músculo se torna más lento y hacia la derecha cuando se torna más rápido, puede ocurrir con cambios en la composición de fibra del músculo. Cuando se usa esta técnica se hace aparente que hay un grado de incertidumbre, principalmente relacionada a la variación en la fuerza desarrollada a bajas frecuencias. A veces hay una potenciación o efecto escalera, y a menudo se observa una disminución relativa en la fuerza desarrollada a bajas frecuencias de estimulación. Se notó (**Edwards et al., 1977b**) que esta última característica persistía por algún tiempo después de un ejercicio fatigante. Las principales características de la FBF son las siguientes: 1.-A bajas frecuencias de estimulación la fuerza muscular está muy afectada. 2.-La recuperación es lenta, tomando horas o días, para una recuperación total. 3.-El efecto persiste en ausencia de la totalidad del metabolismo o disturbio eléctrico del músculo. Fue la recuperación muy lenta la que interesó y el efecto se describió como “fatiga prolongada”. La persistencia del fenómeno la puso aparte de otros tipos de fatiga, que probablemente tenían bases iónicas o metabólicas y se recuperaban en el transcurso de minutos. Por esta razón fue que se sugirió que la FBF puede ser consecuencia de algún daño de la estructura de la fibra muscular y del mecanismo de acoplamiento excitación-contracción (**Jones, 1981**). Esta creencia fue fortalecida por la observación que este tipo de fatiga es más pronunciada después de un ejercicio en el cual el músculo activado está estirado (**Newham et al., 1983**), una forma de ejercicio que puede causar un daño severo, o cuando el músculo es ejercitado isométricamente a un largo mayor (**Jones et al., 1989**). Por consiguiente la recuperación lenta es observada como un proceso de reparación y regeneración con un curso temporal dado por la producción proteica más que por la resíntesis metabólica. Siempre se ha reconocido que la característica pérdida de fuerza a baja frecuencia podría ser explicada por una disminución de la liberación de Ca^{2+} por potencial de acción (**Jones, 1981**). La relación sigmoidal entre fuerza y $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular significa que una pequeña reducción en la concentración sobre el lado derecho de la relación tenga un pequeño efecto sobre la fuerza, aún cuando sobre la parte empinada de la curva una pequeña reducción lleve a una gran pérdida de fuerza.

Mediciones directas de la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular se han hecho en fibras únicas de mamífero (**Westerblad et al., 1993**) y los resultados muestran que para una frecuencia de estimulación dada hay una reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular en fibras fatigadas. No hay evidencia de alteración de la amortiguación del calcio intracelular y la relación entre tensión y $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular no cambia, indicando que la causa de la FBF en esta preparación es una disminución de la liberación desde RS más que una disminución del Ca^{2+} que se une a troponina. A pesar de que una reducción en la liberación de calcio es una explicación satisfactoria de la FBF, hay otra posibilidad que puede jugar alguna parte o aumentar el efecto. Se ha hecho mención a que el efecto de la FBF es un rasgo prominente del músculo fatigado por estiramiento o por ejercicio isométrico a un largo mayor, regímenes que

pueden causar daño al músculo. El mecanismo responsable de este daño no está claro, pero el aspecto dependiente de longitud implica un cambio en alguna estructura que está bajo estrés cuando los sarcómeros están a un largo mayor y se está generando fuerza. Esta consideración gobierna los componentes elásticos en paralelo como los que se descargan cuando el músculo es activado. Se ha sugerido que los elementos en serie dañados durante el estiramiento pueden ser sarcómeros en la mitad de la fibra, elongados por sarcómeros más poderosos en las partes terminales (**Jones et al., 1989**). Una sugerencia muy similar la hizo Morgan (**Morgan, 1990**) la que se denominó teoría de daño muscular de “sarcómeros que estallan”. Esta teoría sugiere que en la fibra dañada la porción central se extiende y genera una pequeña fuerza mientras que las regiones extremas están acortadas y determinan las características contráctiles de toda la fibra. Una de las características inexplicadas de la relación fuerza-frecuencia del músculo es el hecho que es dependiente del largo. A un largo menor del músculo la curva en la gráfica longitud-fuerza se desplaza hacia la derecha, simulando las consecuencias de la FBF. Si una fibra muscular se fatiga de forma que los sarcómeros terminales se sobreextienden y dañan los del centro, la longitud total de la fibra permanece constante, pero los sarcómeros funcionales de los extremos son más cortos que aquellos que están en estado fresco. Consecuentemente la relación fuerza-frecuencia se desplaza hacia la derecha en el gráfico, totalmente independiente de cualquier cambio en la liberación de calcio. La prueba de esta teoría sería ver si, en un músculo que ha experimentado FBF, sufre un cambio en la relación longitud-fuerza. Algunos experimentos preliminares sugieren que este puede ser el caso. Saxton y Donnelly (**Saxton & Donnelly, 1994**) mostraron que la pérdida de fuerza en bíceps humano, dañado por contracciones prolongadas, fue mayor cuando el músculo se probó a largos cortos y menor cuando el músculo fue extendido, indicando un cambio hacia la derecha de la relación longitud-tensión. Hallazgos similares (**Wood et al., 1993**) se hicieron con músculo sartorio de sapo. Es una posibilidad interesante que puede haber dos procesos que ocurren en músculo fatigado que lleva a FBF, una reducción en la liberación de Ca^{2+} y una redistribución de la longitud de sarcómeros.

Provocada la FBF el problema es identificar el o los sitios o el o los mecanismos implicados en ella, un problema multifactorial. La hipótesis más reciente asume algún tipo de vínculo mecánico entre los receptores de DHPR de túbulos T y el canal de calcio en RS, conocido como acoplamiento excitación-contracción (**Meissner & Lu, 1995**). En la FBF alteraciones del acoplamiento excitación-contracción puede disminuir el desempeño muscular por una disminución de la liberación de calcio por RS (**Lamb et al., 1995; Westerblad et al., 1993**). Varios factores y moléculas modifican la función de los canales de RyR del RS, el estado redox, el pH, calmodulina, el calcio o proteasas (**Anzai et al., 2000; Ma & Zhao, 1994; Lamb et al., 1995**). Se ha sugerido que una acumulación de calcio inducida por ejercicio puede causar disminución de la liberación de calcio, provocando fatiga muscular (**Westerblad et al., 2000; Chin & Allen, 1996**), si bien no se conoce el mecanismo, se ha propuesto su ingreso por canales de Na^+ in vitro (**Gissel & Clausen, 1999**). Por otra parte, la captación de calcio por el RS y la actividad Ca^{2+} -ATPasa es disminuída por diferentes protocolos de fatiga o estimulación crónica de baja frecuencia (**Matsushita & Pette, 1992**), de manera que la disminución en la capacidad de captar

calcio está involucrada en la fatiga muscular. El conocimiento actual indica que el daño oxidativo de la bomba de calcio provoca disminución de su actividad (**Matsunaga et al., 2001**). Otras alteraciones relacionadas a la actividad crónica del músculo son daño o hinchazón del RS (**Byrd, 1992**), vacuolación del sistema T (**Lannergren et al., 1999**) y rotura de tríadas (**Lamb et al., 1995**).

1. 10.-RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (RLO).

1.10.1.-Introducción.

Durante el ejercicio se produce un aumento en el VO_2 de manera que el ejercicio extenuante puede inducir un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y las defensas naturales antioxidantes, dando lugar a lo que se denomina estrés oxidativo. Este desequilibrio ha sido implicado en la aparición de fatiga muscular, dolor muscular, alteración de las miofibrillas y disfunción de la respuesta inmune (**Meydani & Evans, 1993**). Los sistemas biológicos pueden ser dañados por las ERO, esto se reconoce como daño oxidativo y comprende ataques a proteínas, ADN y lípidos de membrana, especialmente a los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (**Ji, 1995**).

Se han descrito ataques a estas moléculas por procesos de peroxidación (**Barja de Quiroga, 1997**) que provoca daño por intermedio de las ERO sobre los lípidos celulares. Se forman peróxidos y endoperóxidos que se fragmentan dando una gran diversidad de subproductos, entre los cuales destaca el malondialdehído (MDA) (**Kanter, 1995**). Como consecuencia de la peroxidación lipídica tiene lugar un descenso en los niveles de AGPI en las membranas lo que repercute en sus propiedades. Se produce un aumento de la polaridad de los fosfolípidos y alteraciones de canales iónicos, receptores y otras proteínas de membrana que contribuyen a la alteración de la permeabilidad. La extensión del daño es función de los niveles de AGPI en la membrana, de la presencia de metales como Cu^+ o Fe^{2+} , de la presencia de NADPH y de la producción de ERO. Estos factores hacen que mitocondria y RS sean los más susceptibles a la peroxidación lipídica en condiciones normales (**Somani, 1996**).

La peroxidación lipídica se puede estimar mediante la determinación de distintos marcadores y a través de diversas técnicas. Las más comunes son detección espectrofotométrica y fluorométrica de TBARS (sustancias que reaccionan con ácido tiobarbitúrico), determinación cromatográfica de etano y pentano en aire espirado, valoración de peróxidos y dienos conjugados, generación de quimioluminiscencia y formación de especies fluorescentes por la oxidación de sondas de membrana pro-fluorescentes (**Ohkawa et al., 1979; Leaf et al., 1999; Barja de Quiroga, 1997; Murphy et al., 1998**).

El ataque de las ERO a las proteínas es cuantitativamente inferior al producido sobre los lípidos pero cualitativamente muy importante. Las ERO son responsables de inactivación proteica, de incrementos en la

producción de anión superóxido y de la acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial. Además del ataque directo de las ERO, las proteínas son también susceptibles a la acción de sustancias reactivas originadas por la peroxidación lipídica y la oxidación de monosacáridos (daño indirecto). Los complejos enzimáticos de la fosforilación oxidativa son especialmente sensibles al daño oxidativo produciéndose una reducción de la síntesis de ATP mitocondrial (**Zhang et al., 1990**). De particular interés es la sensibilidad frente al daño oxidativo que presentan procesos y elementos del acoplamiento excitación-contracción (**Oba et al., 1996**). En fibras permeabilizadas de músculo esquelético se ha observado que un sistema donador de $\text{O}^{\bullet}\text{N}$ inhibe la fuerza de la contracción isométrica, la sensibilidad al Ca^{2+} y la actividad actomiosina ATPasa, y que disminuye la velocidad de la contracción (**Balon, 1999**). En cuanto a la Ca^{2+} -ATPasa del RS, la exposición a ERO causa una inhibición paralela de la actividad enzimática y de la captura de Ca^{2+} (**Ishii et al., 1998; Andrade et al., 1998**). El tratamiento origina asimismo un incremento de la permeabilidad para el Ca^{2+} del RS con el consiguiente aumento del flujo pasivo de este ión (**Andrade et al., 1998**). Otros experimentos descartaron que la peroxidación lipídica de membrana del RS sea la causa de la inhibición de la Ca^{2+} -ATPasa producida por las ERO (**Castilho et al., 1996**). Los resultados no son tan concluyentes cuando se investiga el efecto de las ERO sobre la liberación de Ca^{2+} del RS.

Porque respiramos y el oxígeno es una gas reactivo siempre va a existir un cierto daño oxidativo. Sin embargo, junto con el problema se puso la solución, la mayor parte de los radicales libres generados son eliminados mediante sistemas de defensa antioxidante. Si el equilibrio entre producción y destrucción de radicales libres se altera, entonces la célula entra en un proceso degradativo que la puede conducir a la muerte. De aquí la gran importancia de los sistemas de defensa antioxidante, que pueden clasificarse en no enzimáticos, entre los cuales se encuentran moléculas orgánicas de origen endógeno (glutatión) y exógeno (vitaminas C, E y β -carotenos), y enzimáticos (**Powers et al., 1999**). El glutatión es el antioxidante no enzimático más abundante y versátil. Actúa como reductor intracelular y protege a los sistemas celulares de tóxicos exógenos y endógenos, como las ERO. El hígado controla la homeostasis del glutatión, siendo fundamental en el control del daño oxidativo global. En el músculo esquelético, la concentración es aproximadamente 1 a 2 mM, si bien depende del tipo de músculo. Así, en sóleo con metabolismo fundamentalmente aeróbico, es 2 a 5 veces superior a la concentración en la porción profunda o superficial del vasto lateral (**Leeuwenburgh et al., 1994**). La vitamina E es un nombre genérico para un conjunto de tocoferoles y tocotrienoles que se integran en las membranas celulares. De ellos, el α -tocoferol es el que muestra mayor capacidad antioxidante. La vitamina E es particularmente importante en los orgánulos y tejidos que contienen niveles relativamente altos de AGPI. La vitamina C es un antioxidante hidrosoluble que sólo tiene carácter vitamínico en algunos animales como el hombre y la cobaya y al que se atribuyen diversas funciones celulares. Como antioxidante en el citosol, se encarga de desactivar el oxígeno singlete, reacciona directamente con el anión $\text{O}_2^{\bullet-}$ para formar H_2O_2 , reduce el radical $\text{O}^{\bullet}\text{H}$ y peróxidos orgánicos, regenera el α -tocoferol en la interfase membrana-citosol y desactiva el

peroxinitrito (**Kanter, 1995; Barja de Quiroga, 1997; Ducrocq et al., 1999**). Existen otras sustancias con capacidad antioxidante que pueden producirse en el organismo o proceder de la dieta entre las que destacan los carotenoides, el ácido úrico, la ubiquinona o coenzima Q₁₀ y la melatonina. Hay dudas sobre si las concentraciones celulares de éstas son suficientemente altas para constituir defensas antioxidantes eficaces (**Romero et al., 1999**).

En los sistemas enzimáticos la superóxidodismutasa (SOD) es la primera defensa que presenta la célula frente a las ERO. Desde que fuera descrita (**McCord & Fridovich, 1969**) se han hallado dos isoenzimas en eucariontes, que presentan diferencias en los cofactores metálicos y en sus localizaciones celulares, a saber, la Cu,Zn-SOD y la Mn-SOD. La máxima actividad se localiza en hígado, donde el 70 a 90 % de la actividad es citosólica y el 10 a 30 % es mitocondrial, seguido de riñón, cerebro, corazón y músculo esquelético, donde parece independiente del tipo de fibras (**Ji, 1995; Barja de Quiroga, 1997**). La catalasa (CAT) cataliza la reacción de dismutación del H₂O₂ por lo que es una pieza central en la prevención del daño oxidativo. Está especialmente presente en los peroxisomas, aunque parece encontrarse distribuída en toda la célula, incluso en la mitocondria. La máxima actividad se halla en el hígado, es moderada en el corazón y baja en el músculo esquelético, dependiendo sus niveles del tipo de fibras (**Barja de Quiroga, 1997; Powers et al., 1999**). La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima que cataliza la reducción del H₂O₂ e hidroperóxidos orgánicos hasta H₂O y el alcohol correspondiente, respectivamente, usando GSH como reductor. Se localiza en el citosol (2/3 partes) y en la mitocondria (1/3 parte), lo que le permite acceder a múltiples fuentes de producción de hidroperóxidos. Su actividad es muy alta en el hígado, moderada en el cerebro y corazón y baja en el músculo esquelético, dependiendo del tipo de fibras (**Ji, 1995; Kanter, 1995**). La glutatión reductasa (GR) es una flavoenzima que emplea NADPH en la reducción del GSSG (**Barja de Quiroga, 1997; Powers et al., 1999**). Su actividad es muy importante puesto que la concentración de glutatión es limitada y un incremento en el cociente GSSG/GSH total resulta altamente tóxico para la célula. Además, es de vital importancia para la eliminación de H₂O₂ por la GPx y de otras ERO por el GSH mediante mecanismos no enzimáticos. Se encuentran acopladas a la GR las actividades isocitrato deshidrogenasa (ICDH), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa proporcionándole el NADPH necesario para su actividad (**Ji, 1995; Barja de Quiroga, 1997; Powers et al., 1999**), de forma que estas enzimas constituyen una segunda línea de defensa antioxidante. En hígado, donde se halla la máxima actividad de todos los antioxidantes por su papel central en detoxificación, y en eritrocitos, está presente una extraordinaria actividad GR acoplada a la producción de NADPH por parte de la ruta de las pentosas fosfato. En músculo, la GR está acoplada a la ICDH, presentado mayor actividad GR el corazón y después los músculos con alta proporción de fibras lentas. La distribución celular y la actividad GR son similares a los de la GPx (**Ji, 1995; Powers et al., 1999**).

1.10.2.-Estrés oxidativo inducido por ejercicio.

El ejercicio de resistencia está asociado con aumento del VO_2 por el músculo, especialmente de las fibras tipo I. Mucho oxígeno es utilizado para el metabolismo y producción de ATP y es reducido a agua. Sin embargo, una pequeña fracción (~ 2-5 %) puede ser convertido en varios intermediarios ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $\bullet\text{OH}$), que escapan de la cadena transportadora de electrones (**Hicks, 2001**). Durante el ejercicio aeróbico el VO_2 aumenta aproximadamente 15 veces más que el de reposo (**Sen, 1995**). Este aumento es particularmente alto en el músculo esquelético (~200 veces el de reposo), por la alta demanda de ATP (**Itoh et al., 1998; Powers et al., 1999**). Para mantener alta la producción de ATP el flujo de oxígeno plasmático aumenta 30 veces más que en reposo (**Sen, 1995**).

Se ha propuesto que asociado al aumento del VO_2 durante el ejercicio existe un incremento en la producción de RLO (**Powers et al., 1999**). Entre las vías que podrían explicar este aumento de la producción de RLO, se acepta que la fundamental es la cadena transportadora de electrones mitocondrial, responsable de más del 90 % del VO_2 celular (**Barja de Quiroga, 1997**). De este modo, los incrementos en la velocidad de generación de ERO se asocian a una producción aumentada de RLO en la mitocondria (**Child et al., 1998; Powers et al., 1999**).

Se han propuesto otros mecanismos como posibles vías de aparición de estrés oxidativo asociado al ejercicio. Se sugiere que la hipertermia inducida por el ejercicio puede provocar un desacoplamiento mitocondrial, lo que originaría estrés oxidativo (**Salo et al., 1991**). Además, el incremento en los niveles de catecolaminas (**Cohen & Heikkila, 1974**) y de ácido láctico (**Demopoulos et al., 1986**) y un mayor ritmo de autooxidación de la hemoglobina (**Misra & Fridovich, 1972**) puede incrementar la producción de RLO. Por otra parte, la invasión leucocítica muscular provocada por daño muscular ante ejercicio intenso puede inducir estrés oxidativo (**Smith et al., 1989**). Finalmente, el incremento en la producción de $\text{O}^{\bullet}\text{N}$ en el músculo activo (**Balon, 1999**) que puede reaccionar con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ generando peroxinitrito, también podría originar estrés oxidativo.

Mediante el empleo de la resonancia de espín electrónico (REE) se ha podido determinar que la concentración de RLO en hígado y músculo esquelético se llega a duplicar respecto de los niveles en reposo tras una sesión de ejercicio intenso (**Davies et al., 1982**). Estudios recientes en ratas sometidas a sesiones de ejercicio aeróbico de intensidad progresiva (hasta el 75 % del VO_2 max) han detectado por REE un incremento de 20 a 30% en la producción de RLO en músculo esquelético (**Li et al., 1998**). Actualmente hay métodos indirectos de detección de RLO, como es la captura del radical OH^{\bullet} por el ácido salicílico para formar subproductos específicos (ácidos 2,3- y 2,5-dihidroxibenzoicos) que se aíslan por técnicas de HPLC y se determinan espectroscópicamente. Usando esta técnica (**Ohkuwa et al., 1997**) encontraron incrementos en la formación de radical OH^{\bullet} en plasma, corazón, pulmón, hígado, cerebro y músculo esquelético de rata tras una sesión de ejercicio intenso. Otro método consiste en emplear pro-fluoróforos que penetren al interior de las mitocondrias y

se conviertan en fluoróforos por parte de las ERO. Mediante esta técnica se han detectado aumentos en la producción de ERO como consecuencia de sesiones de ejercicio intenso en músculo esquelético (**Bejma et al., 1998**), corazón (**Ji et al., 1998**) e hígado (**Bejma et al., 1999**) de rata. El H_2O_2 es una ERO relativamente estable y que difunde fácilmente a través de la membrana y puede detectarse en sangre. Así, se sugiere que la producción de ERO se incrementa tras una sesión de ejercicio en humanos al detectar un importante incremento en los niveles de H_2O_2 en plasma (**Deskur et al., 1998**).

Una vez detectados los incrementos de ERO, la cuestión es si éstos son capaces de superar las capacidades antioxidantes tisulares e inducir estrés oxidativo. Se ha propuesto que el estrés oxidativo es responsables, al menos en parte, de la fatiga muscular, dado que algunas ERO (como los hidroperóxidos) pueden causar alteraciones en los sistemas de reentrada de K^+ a las células musculares tras el potencial de acción y parecen afectar el papel del RS y los túbulos T en la contracción muscular. Se ha observado que usando agentes quelantes del Fe^{2+} (**Sen, 1995**) y sequestrantes de ERO (**Leeuwenburgh & Ji, 1998**) se retarda la aparición de la fatiga muscular durante el ejercicio.

Los métodos más utilizados para detectar estrés oxidativo son los marcadores de peroxidación lipídica, sin embargo, los resultados son contradictorios. Se han descrito incrementos en los niveles de TBARS y otros marcadores de peroxidación lipídica en plasma (**Khanna et al., 1999**), músculo esquelético (**Sen et al., 1994**) e hígado (**Venditti & Di Meo, 1997**) de ratas sometidas a una sesión de ejercicio moderado o intenso. En este mismo modelo se han detectado incrementos en los niveles de TBARS y disminuciones en la fluidez de las membranas de mitocondrias aisladas de gastrocnemius (**Li et al., 1999**). En corazón, la mayoría de los estudios realizados no muestran aumentos en estos parámetros por efecto del ejercicio (**Venditti & Di Meo, 1997**). Se ha observado mediante determinaciones de TBARS que la peroxidación lipídica está correlacionada con la intensidad de la carrera en rata (**Alessio & Goldfarb, 1988**). Además, se ha demostrado que la oxidación de GSH a GSSG en músculo esquelético se incrementa en ratas sometidas a carrera en función del trabajo (**Ji et al., 1992**). Factores que pueden explicar estas aparentes discrepancias serían la especie animal y tejidos estudiados, el estrés emocional, el grado de preparación de los individuos y el momento de la toma de la muestra (**Kanter, 1994; Somani, 1996; Ortenblad et al., 1997**).

En cuanto a los estudios que pretenden determinar el posible estrés oxidativo producido sobre las proteínas y el ADN durante una sesión de ejercicio, la bibliografía es escasa. Se han hallado incrementos en niveles de derivados carbonilo proteicos en ratas sometidas a ejercicio aeróbico intenso o extenuante en músculo esquelético (**Bejma et al., 1998**). También se han detectado aumentos en el contenido de grupos carbonilo en el RS y niveles incrementados de nitrotirosina en la Ca^{2+} -ATPasa en músculo rápido de conejo sometido a electroestimulación (**Bert et al., 1998**). Se ha sugerido que la modificación enzimática, debida al ataque del peroxinitrilo a los residuos de tirosina, podría estar implicada en la rápida inactivación de la Ca^{2+} -ATPasa que

precede a la transición de isoformas de la SERCA (I → II) característica de este modelo de actividad contráctil incrementada.

1.10.3.-Adaptación de los sistemas antioxidantes a una sesión de ejercicio.

En cuanto a los sistemas enzimáticos se han descrito incrementos en las actividades de ambas enzimas de la SOD, en la GPx y la catalasa de tejidos como corazón, pulmón, músculo esquelético e hígado (**Ji et al., 1990; Ji & Fu, 1992; Reddy et al., 1992; Lawler et al., 1993; Hara et al., 1996**). Los resultados referidos al sistema de glutatión, tanto en cuanto al estado redox como en cuanto a la actividad GR, son controvertidos. Fundamentalmente se han descrito dos situaciones distintas. En algunos estudios se detectan incrementos de GSSG y descensos de GSH en músculo esquelético, aumentos tanto de GSH como de GSSG en plasma (reduciéndose el cociente GSH/GSSG) y elevación de los niveles de GSSG hepático, sin variación de GSH, habiendo sido relacionados estos resultados con un intenso flujo hepático (**Sen et al., 1992; Sen et al., 1994**). Por el contrario, en otras investigaciones los niveles hepáticos apenas se modifican, manteniéndose el cociente GSH/GSSG muscular y aumentando en este tejido tanto el GSH como el GSSG, mientras que en plasma sólo disminuye el GSH (**Somani, 1996**). Por otra parte, el corazón parece presentar unos niveles adecuados de GSH, apareciendo a lo sumo variaciones muy discretas en los niveles que no modifican el cociente GSH/GSSG (**Leeuwenburg et al., 1994**). Respecto de la vitamina E, se ha comprobado que una sesión de ejercicio no parece afectar significativamente los niveles en músculo esquelético, hígado y corazón (**Tiidus & Houston, 1993**). Sin embargo, se han descrito disminuciones en el contenido de vitamina E en músculo esquelético, corazón e hígado (**Bowles et al., 1991; Benderitter et al., 1996; Venditti et al., 1999**).

1.10.4.-Adaptación de los sistemas antioxidantes inducidos por el entrenamiento.

La evidencia experimental apoya la idea de que como consecuencia del entrenamiento físico las ERO actúan como inductores de los sistemas antioxidantes, especialmente en músculo esquelético (**Ji, 1993; Meydani & Evans, 1993**). En la mayoría de los estudios, la SOD, especialmente la actividad mitocondrial, muestra aumentos significativos en su actividad como adaptación al entrenamiento (**Powers et al., 1994; Navarro-Arévalo & Sánchez del Pino, 1998**). En el caso de la catalasa, la mayor parte de las investigaciones no revelan variaciones de actividad (**Meydani & Evans, 1993; Leeuwenburg et al., 1994**), existiendo casos de incrementos (**Jenkins, 1993**) e incluso descensos (**Laughlin et al., 1990**). La actividad GPx aumenta en casi todos los estudios (**Sen et al., 1992; Leeuwenburg et al., 1997**). Considerando que en la mayor parte de los casos la actividad de la catalasa no se modifica y la GPx aumenta, cabe pensar que esta adaptación protege de manera más eficaz de la producción mitocondrial incrementada de H₂O₂ durante el ejercicio. Por otra parte, se ha

observado que la inducción tanto de SOD como de la GPx es selectiva en función del carácter oxidativo del músculo esquelético estudiado, sin observarse esta dependencia en la catalasa (**Powers et al., 1994**). En la actividad GR la mayor parte de los autores han observado incrementos como consecuencia del entrenamiento (**Sen et al., 1992; Ji, 1993; Venditti & Di Meo, 1997**). Por otra parte, se han descrito distintas adaptaciones de los niveles y estado redox del glutatión en respuesta a entrenamientos de alta intensidad y duración. Los niveles de glutatión total se hallan aumentados en hígado, pulmón y músculo esquelético (**Sen et al., 1992; Kretzschmar & Müller, 1993; Hara et al., 1996**). En músculo, el entrenamiento mejora la captura de GSH del plasma aumentando las actividades implicadas en el ciclo del γ -glutamilo (**Marin et al., 1990**) de modo que se favorece la síntesis de GSH muscular. Otros estudios no revelan variaciones en este sistema (**Leeuwenburgh et al., 1994; Hara et al., 1996**).

Generalmente se acepta que las vitaminas E y C y el β -caroteno juegan un importante papel en la protección celular frente al daño por RLO durante el ejercicio intenso (**Goldfarb, 1993; Packer, 1986**). Puesto que, excepto en algunas especies, la vitamina E no es sintetizada por los mamíferos, en teoría el entrenamiento de resistencia podría reducir sus niveles, a no ser que se suplemente en la dieta. Así, se ha descrito que los niveles de vitamina E disminuyen en músculo esquelético, hígado y corazón de ratas sometidas a este tipo de entrenamiento (**Tiidus & Houston, 1993; Aikawa et al., 1984; Packer et al., 1989**).

1.11.-CAUSAS DE LA FATIGA MUSCULAR.

En resumen la fatiga muscular puede tener varios orígenes:

A.-Una disminución progresiva de la frecuencia de descarga de la motoneurona alfa, lo cual sitúa el fenómeno a nivel central en el asta anterior del cordón espinal, en donde los somas de las motoneuronas alfa reciben aferencias excitadoras e inhibitoras. En este caso la fatiga muscular es realmente un fenómeno manejado desde el nivel central, cuyo objetivo es más bien de protección de las fibras musculares inervadas para cuidar que éstas no se expongan a un trabajo excesivo que pueda alterar su homeostasis.

B.-Una segunda posibilidad es que una descarga excesiva de la motoneurona alfa produzca un vaciamiento del almacenamiento del neurotransmisor acetilcolina o que la liberación del neurotransmisor supere la capacidad de recaptación y/o de resíntesis del mismo. En este caso hablaríamos de una fatiga de la sinapsis neuromuscular.

C.-Una tercera posibilidad radica en la capacidad de la membrana de la fibra muscular para generar un potencial de reposo adecuado y por lo tanto de un potencial de acción adecuado. En esto se involucran iones Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} principalmente. Una acumulación de iones K^+ en el líquido extracelular puede provocar un desbalance

electroquímico que tenga por consecuencia que la membrana celular quede en estado de hiperpolarización y de depolarización más tardíamente, lo cual dejaría a la fibra muscular sin poder responder. Un ingreso de iones Cl^- puede provocar un estado de negatividad interna que conduzca a una hiperpolarización; al respecto mencionamos unos canales Cl^- -1 modulados por ATP (**Bennetts et al., 2005**).

D.-Una cuarta posibilidad es que una disminución excesiva del almacenamiento de ATP o un balance negativo entre su producción y utilización tiene un importante efecto sobre las bombas metabólicas que, por ejemplo, restauran la concentración del Ca^{2+} citoplasmático y de los iones Na^+ y K^+ que participan en la génesis del potencial de reposo y de acción. Un exceso de iones Na^+ y Ca^{2+} en el citoplasma de la fibra muscular tiene un efecto sobre el equilibrio electroquímico de la célula que puede conducir a una acumulación de agua y al establecimiento de unas uniones más permanentes entre actina y miosina. Más aún, la disminución del ATP se relaciona con la generación de complejos permanentes entre actina y miosina, denominados complejos rigor, debido a que para que las cabezas de miosina se suelten de los puntos de unión con actina se necesita de una concentración adecuada de ATP. Por otra parte, la disminución de ATP significa que las cabezas de miosina no dispondrán de la energía necesaria para dar los golpes de potencia que conducen a la contracción muscular.

E.-Una quinta posibilidad se relaciona con modificaciones a nivel de la tríada en cuanto el funcionamiento de los receptores de dihidropiridina y de rianodina, que puede conducir a una disminución de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático.

F.-Una sexta posibilidad se relaciona con una disminución del almacenamiento de sustratos energéticos como glucógeno y glucosa. Esta situación puede significar que la vía glucolítica se quede sin las fuentes para su normal funcionamiento conducente a la síntesis de ATP.

G.-Una séptima posibilidad radica en un desbalance en los niveles de metabolitos de la vía glucolítica. Esta situación, con tiempos de estimulación cortos, puede generar un mal funcionamiento de la vía glucolítica.

H.-Una octava posibilidad es que producto de la estimulación se produzcan cambios estructurales en distintos lugares de la fibra muscular, como sarcolema, túbulos T, RS, etc, cuya consecuencia sea una alteración fisiológica.

I.-Una novena posibilidad es que la estimulación produzca la generación de radicales libres que conduzcan a la peroxidación de lípidos de membrana, cuya consecuencia sea una desorganización estructural que conduzca a una alteración fisiológica.

1.12.-OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar un estudio sobre fatiga muscular en sus etapas más precoces, inducida por estimulación de baja frecuencia.

1.13.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.-Estudiar la amplitud el potencial de acción compuesto del músculo, onda M, después de períodos cortos de estimulación y descanso.

2.-Estudiar los cambios del metabolismo energético que experimenta el músculo esquelético después de períodos cortos de estimulación y descanso.

3.-Estudiar los cambios que experimenta la fracción microsomal (retículo sarcoplasmático) del músculo esquelético después de períodos cortos de estimulación y descanso.

4.-Estudiar los cambios que experimenta la peroxidación lipídica (malondialdehído) del músculo esquelético después de períodos cortos de estimulación y descanso.

5.-Estudiar los cambios que experimenta la resistencia a la fatiga del músculo esquelético después de períodos cortos de estimulación y descanso.

1.14.-HIPÓTESIS.

El músculo esquelético rápido tibial anterior de conejo modifica sus propiedades estructurales, funcionales y bioquímicas por efecto de la estimulación de baja frecuencia de corta duración.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Animales de experimentación, anestesia e implante de electrodos.

Se utilizó conejos hembra adultos White New Zealand de 2,5 a 3,5 kg, de 3 meses de edad. Permanecieron 7 días en observación antes de iniciar el estudio. Procedimientos y técnicas se hicieron de acuerdo a las normas establecidas por el Comité de Bioética de la Universidad de Barcelona. Se preanestesió con inyección i.m. de una mezcla de 1 mg/kg de maleato de acepromazina (Calmo Neosan, Pfizer, S.A.) y 0,2 mg/kg de sulfato de atropina (Sigma), durante 30 min. Se anestesió con inyección i.m. de 20 mg/kg de ketamina (Ketolar ®, Parke-Davis) hasta fase profunda en 15 a 20 min. De ser necesario se inyectó dosis extras de ketamina cada 30 min, mitad de la dosis inicial (Flecknell, 1987). A ambos lados del nervio peroneo se implantó electrodos de acero inoxidable de 0,2 mm de sección, 1 cm de largo, en espiral.

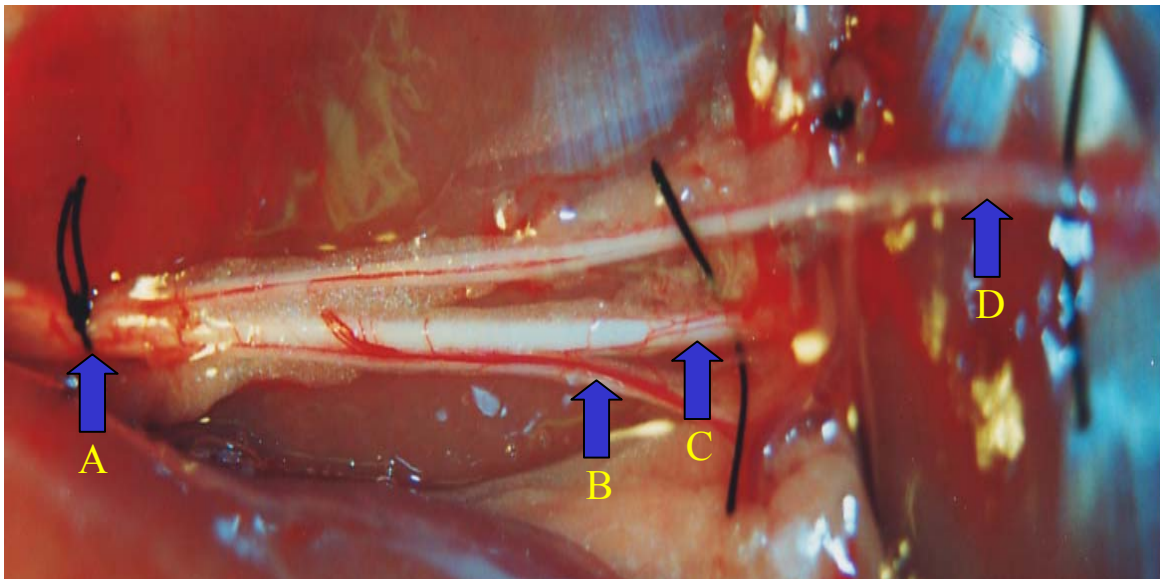


Figura 2.1.- La disección roma muestra la inervación de la parte baja de la pierna del conejo. (A) nervio ciático, (B) nervio sural (sensitivo), (C) nervio tibial posterior, (D) nervio peroneo.

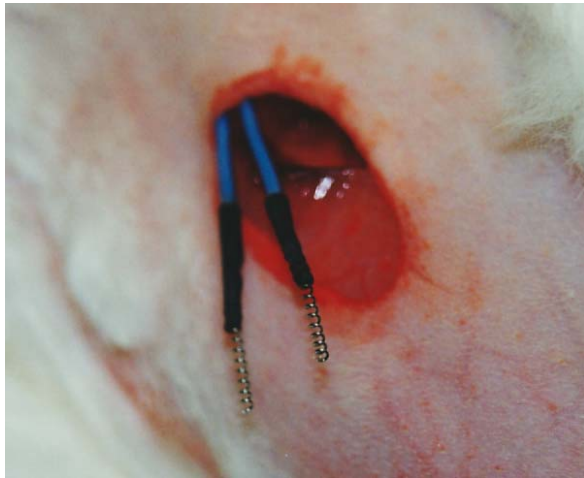


Figura 2.2.-Electrodos estimulación en espiral antes de ser suturados alrededor del nervio peroneo.

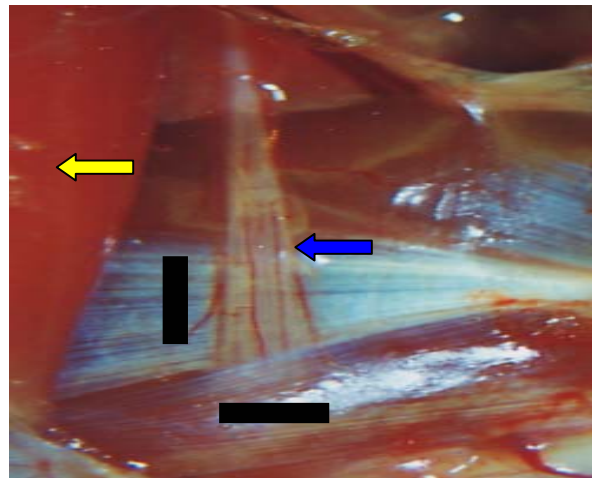


Figura 2.3.-Disección para mostrar nervio peroneo (flecha azul). Bíceps femoral se hizo a un lado (flecha amarilla). Las barras negras muestran la posición de los electrodos.

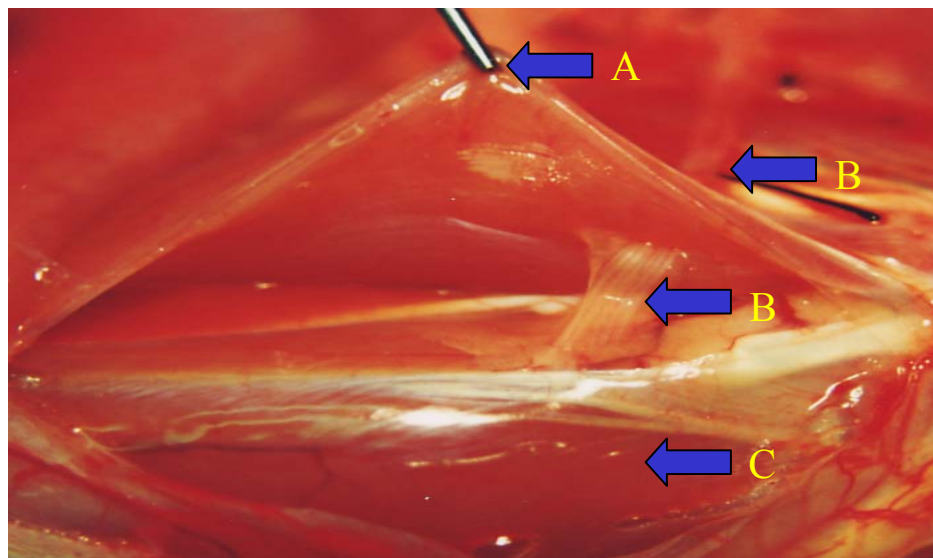


Figura 2.4.-Disección del músculo peroneus longus (A) para mostrar al nervio peroneo (B) que lo atraviesa y su llegada al músculo tibial anterior (C).

2.2.-Protocolo de estimulación eléctrica y grupos experimentales.

Se estimuló a 10 Hz, con una duración de pulso de 0,15 ms, 2-5 V. Los grupos formados se indican en el cuadro adjunto.

| | | | | | |
|---|-----|----|----|-----|-----|
| C | 20" | 1' | 5' | 15' | 30' |
|---|-----|----|----|-----|-----|

| | | | | |
|-------|-------|--------|--------|-------|
| 1'30' | 5'30' | 15'30' | 30'30' | 30'3h |
|-------|-------|--------|--------|-------|

| | | | | |
|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| 1'30'20" | 5'30'20" | 15'30'20" | 30'30'20" | 30'3h20" |
|----------|----------|-----------|-----------|----------|

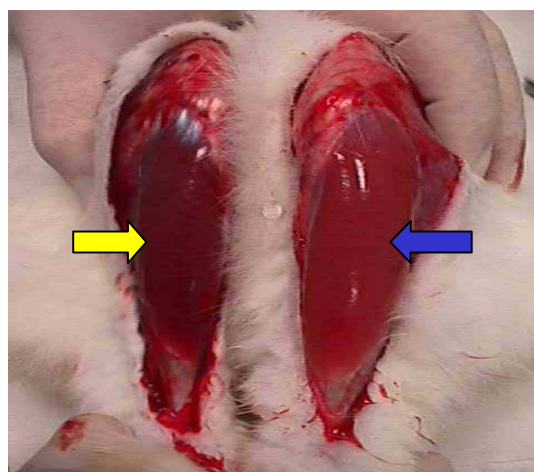
Cuadro grupos.-En la parte superior se indica grupo control (C) y tiempos de estimulación en segundos (") y minutos (').

En el medio grupos con tiempos de estimulación y descanso en minutos (') y horas (h). En la parte inferior grupos estimulados, descansados y con estimulación final en segundos (").

2.3.-Obtención del músculo.

Se expuso los músculos tibial anterior mediante cirugía muy cuidadosa dejando intactos nervio, vasos sanguíneos, tejido conectivo y tendón. Finalizada la estimulación se aíslan los músculos de ambas extremidades y se apretan fuertemente con tenaza plana enfriada en N₂ líquido, lo que disminuye el grosor del músculo de manera que el N₂ lo congela rápidamente; se extrae el músculo y se introduce en N₂. La maniobra dura 1-2 s. Luego se almacenan a -80° C.

Figura 2.5.-Músculos tibial anterior control (flecha azul) y estimulado (flecha amarilla) segundos antes de ser extraídos y sumergidos en nitrógeno líquido.



2.4.-Pulverización del músculo.

La pulverización se realiza en N₂ líquido, el músculo se raspa para extraer sangre y epimisio, se trocea, se pulveriza con mortero de acero, se extrae restos de conectivo y se almacena a -80°C.



Figura 2.6.-Se muestra el músculo congelado, el mortero de acero y el mazo para pulverizarlo.

2.5.-Extracción de metabolitos.

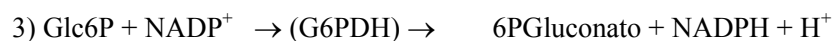
Los metabolitos se valoran en extractos libres de proteínas preparados en un medio con ácido perclórico (HClO₄) (Harris et al., 1974), el ácido perclórico se elimina por precipitación como sal de potasio. El método consiste en: se pesan 15 a 25 mg de pulverizado en tubo Eppendorf; se agrega 600 µl de HClO₄ 0.5 M y se homogeniza con pistilo de teflón, en frío; se centrifuga a 13.000 rpm (15.000 g) a 4° C, por 10 min; del sobrenadante se toman 540 µl, se colocan en tubo Eppendorf, se agregan 135 µl de KHCO₃ 2.3 M, se extrae el gas producido, en frío; se centrifuga a 13.000 rpm (15.000 g) a 4° C, por 10 min; del sobrenadante se toman 660 µl. En este extracto se valora de inmediato ATP, PCr y creatina. Glucosa, Glc6P, Fru6P, Fru1,6P₂, DHAP, Gli3P, piruvato y lactato se valoran posteriormente. Se almacena a -80°C.

2.6.-Soluciones estándar.

ATP 200 µM, creatina 400 µM, piruvato 10 µM, lactato 400 µM, G6P 5 µM + glucosa 10 µM y F1,6P₂ 2 µM. Los reactivos se pesan, diluyen, se reparte alicuotas en tubos Eppendorf y se congelan a -40° C.

2.7.-Determinación de ATP y PCr (Lowry & Passoneau, 1972).

- 1) PCr + ADP → (CK) → Creatina + ATP
- 2) ATP + Glucosa → (HK) → ADP + Glc6P



2.7.1.-Reactivos y enzimas.

Tampón Tris-HCl 1 M, pH 8.1; MgCl_2 1 M; DTT 0.5 M; Glucosa 100 mM; NADP 50 mM; G6PDH 350 U/ml; HK 1.500 U/ml (diluída para 0.14 U/ml; 1 ml de cóctel + 5 μl de HK); 1 ml de cóctel + 10 μl BSA 10 % + ADP 2 mg + CK 2 mg.

2.7.2.-Preparación del cóctel o mezcla de reacción.

Se prepara el cóctel que contiene los siguientes reactivos y enzimas, a las concentraciones finales indicadas: Tampón Tris 50 mM pH 8.1; MgCl_2 1 mM; DTT 100 μM ; Glucosa 100 μM ; NADP 50 μM ; ajustar a pH 8.1; G6PDH 0.02 U/ml.

2.7.3.-Preparación del ensayo. Fluorímetro excitación 340 nm, emisión 465 nm, 400 V.

3 tubos blanco, 3 tubos estándar y 2 tubos problema; 1 ml de cóctel a todos los tubos; 10 μl de agua destilada a tubos blanco; 10 μl de ATP 200 μM a tubos estándar; 10 μl de muestra a tubos problema; agitar con vórtex y leer fluorescencia; 25 μl de HK diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 30 min en oscuridad y leer fluorescencia. El incremento de fluorescencia producida indica la concentración de ATP; 20 μl de CK diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 60 min en oscuridad y leer fluorescencia. El incremento de fluorescencia producida indica la concentración de CP.

2.8.- Determinación de creatina (Lowry & Passoneau, 1972).

- 1) Creatina + ATP \rightarrow (CK) \rightarrow ADP + PCr
- 2) ADP + PEP \rightarrow (PK) \rightarrow ATP + Piruvato
- 3) Piruvato + NADH + H^+ \rightarrow (LDH) \rightarrow Lactato + NAD^+

2.8.1.-Reactivos y enzimas.

Tampón Imidazol 1 M; MgCl_2 1 M; KCl 1 M; PEP 10 mM; ATP mg de acuerdo al volumen de cóctel que se necesita preparar; NADH 15 mM; LDH 550 U/ml; PK 2000 U/ml; 1 ml de cóctel + 10 μl de BSA 10 % + 5 mg de CK.

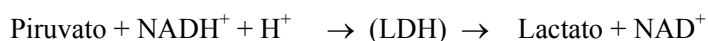
2.8.2.-Preparación del cóctel o mezcla de reacción.

Se prepara el cóctel que contiene los siguientes reactivos y enzimas, a las concentraciones finales indicadas: Tampón Imidazol 50 mM; MgCl₂ 5 mM; KCl 30 mM; PEP 25 μM; ATP 200 μM; NADH 45 μM; ajustar a pH 7.5; LDH 0.24 U/ml; PK 0.75 U/ml.

2.8.3.-Preparación del ensayo. Fluorímetro excitación 340 nm, emisión 465 nm, 400 V.

3 tubos blanco, 3 tubos estándar y 2 tubos problema; 1 ml de cóctel a todos los tubos; 10 μl de agua destilada a tubos blanco; 10 μl de creatina 400 μM a tubos estándar; 10 μl de muestra a tubos problema; agitar con vórtex, 30 min en oscuridad y leer fluorescencia; 25 μl de CK diluída; agitar con vórtex, 30 min en oscuridad y leer fluorescencia. La disminución de la fluorescencia producida indica la concentración de creatina.

2.9.-Determinación de piruvato (Lowry & Passoneau, 1972).



2.9.1.-Reactivos y enzimas.

Tampón fosfato 50 mM; NADH 15 mM; LDH 550 U/ml (diluída para 0.6 U/ml; 2 ml de cóctel + 10 μl de LDH).

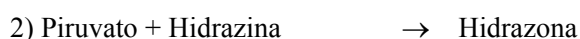
2.9.2.-Preparación del cóctel o mezcla de reacción.

Se prepara el cóctel que contiene los siguientes reactivos y enzimas, a las concentraciones finales indicadas: Tampón fosfato 50 mM; NADH 750 μM; ajustar a pH 7.0.

2.9.3.-Preparación del ensayo. Fluorímetro excitación 340 nm, emisión 465 nm, 500 V.

3 tubos blanco, 3 tubos estándar y 2 tubos problema; 1 ml de cóctel a todos los tubos; 50 μl de agua destilada a tubos blanco; 50 μl de piruvato 10 μM a tubos estándar; 50 μl de muestra a tubos problema; agitar con vórtex y leer fluorescencia; 10 μl de LDH diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 20 min en oscuridad y leer fluorescencia. La disminución de la fluorescencia producida indica la concentración de piruvato.

2.10.-Determinación de lactato (Lowry & Passoneau, 1972).



La reacción se realiza en medio alcalino y en presencia de hidrazina. De esta manera la reacción está desplazada hacia la formación de piruvato, el que se combina con la hidrazina, evitándose que la reacción revierta.

2.10.1.-Reactivos y enzimas.

Hidrazina 1 M; Glicina 1 M; NAD 100 mM; LDH 550 U/ml (diluída para 8 U/ml; 1 ml de cóctel + 250 µl de LDH).

2.10.2.-Preparación del cóctel o mezcla de reacción.

Se prepara el cóctel que contiene los siguientes reactivos y enzimas, a las concentraciones finales indicadas: Hidrazina 100 mM; Glicina 100 mM; NAD 0.5 mM; ajustar a pH 10

2.10.3.-Preparación del ensayo. Fluorímetro excitación 340 nm, emisión 465 nm, 400 V.

3 tubos blanco, 3 tubos estándar y 2 tubos problema; 1 ml de cóctel a todos los tubos; 10 µl de agua destilada a tubos blanco; 10 µl de lactato 400 µM a tubos estándar; 10 µl de muestra a tubos problema; agitar con vórtex y leer fluorescencia; 25 µl de LDH diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 60 min en oscuridad y leer fluorescencia. El incremento de fluorescencia producida indica la concentración de lactato.

2.11.-Determinación de Glc6P, Glc1P, Fru6P y glucosa (Lowry & Passoneau, 1972).

- 1) Glucosa + ATP → (HK) → Glc6P + ADP
- 2) Fru6P + ATP → (PGI) → Glc6P + ADP
- 3) Glc1P + ATP → (PGM) → Glc6P + ADP
- 4) Glc6P + NADP → (G6PDH) → 6PGluconato + NADPH + H⁺

2.11.1.-Reactivos y enzimas.

Tampón Tris-HCl 1 M, pH 8.1; MgCl₂ 1 M; DTT 0.5 M; ATP 300 mM; NADP 50 mM; EDTA 200 mM; G6PDH 350 U/ml (diluída para 0.02 U/ml; 1.5 ml de cóctel + 10 µl de G6PDH); PGM 400 U/ml (diluída para 0.065 U/ml; 1 ml de cóctel + 20 µl de PGM); PGI 3500 U/ml (diluída para 0.35 U/ml; 1 ml de cóctel + 10 µl de PGI); HK 280 U/ml (diluída para 0.14 U/ml; 1 ml de cóctel + 25 µl de HK).

2.11.2.-Preparación del cóctel o mezcla de reacción.

Se prepara el cóctel que contiene los siguientes reactivos y enzimas, a las concentraciones finales indicadas: Tris 50 mM; MgCl₂ 1 mM; DTT 0.5 mM; ATP 300 µM; NADP 50 µM; EDTA 100 µM; ajustar a pH 8.

2.11.3.-Preparación del ensayo. Fluorímetro excitación 340 nm, emisión 465 nm, 500 V.

3 tubos blanco, 3 tubos estándar y 2 tubos problema; 1 ml de cóctel a todos los tubos; 100 µl de agua destilada a tubos blanco; 100 µl de Glc6P 5 µM + Glucosa 10 µM a tubos estándar; 100 µl de muestra a tubos problema; agitar con vórtex y leer fluorescencia; 10 µl de G6PDH diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 15 min en

oscuridad y leer fluorescencia. El aumento de la fluorescencia indica la concentración de Glc6P; 10 μ l de PGM diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 15 min en oscuridad y leer fluorescencia. El aumento de la fluorescencia indica la concentración de Glc1P; 10 μ l de PGI diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 15 min en oscuridad y leer fluorescencia. El aumento de la fluorescencia indica la concentración de Fru6P; 25 μ l de HK diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 15 min en oscuridad y leer fluorescencia. El aumento de la fluorescencia indica la concentración de glucosa.

2.12.-Determinación de Gli3P, DHAP y Fru1,6P₂ (Lowry & Passoneau, 1972).

- 1) Fru1,6P₂ → (ALD) → DHAP + Gli3P
- 2) DHAP → (TPI) → Gli3P
- 3) Gli3P + NAD⁺ → (Gli3PDH) → 3PGlicerato + NADH + H⁺

2.12.1.-Reactivos y enzimas.

Tampón Imidazol 1 M; NAD 100 mM; Na₂HAsO₄ 1 M; EDTA 200 mM; β -Mercaptoetanol 14.3 M; Gli3PDH 800 U/ml (diluída para 0.8 U/ml; 1 ml de cóctel + 10 μ l de Gli3PDH); TPI 6.135 U/ml (diluída para 2.4 U/ml; 1 ml de cóctel + 10 μ l de TPI); Aldolasa 90 U/ml (diluída para 0.02 U/ml; 1 ml de cóctel + 10 μ l de aldolasa).

2.12.2.-Preparación del cóctel o mezcla de reacción.

Se prepara el cóctel que contiene los siguientes reactivos y enzimas, a las concentraciones finales indicadas: Tampón Imidazol 50 mM; NAD 100 μ M; Na₂HAsO₄ 1 mM; EDTA 1 mM; β -Mercaptoetanol 2 mM; ajustar a pH 7.5

2.12.3.-Preparación del ensayo. Fluorímetro excitación 340 nm, emisión 465 nm, 500 V.

3 tubos blanco, 3 tubos estándar y 2 tubos problema; 1 ml de cóctel a todos los tubos; 75 μ l de agua destilada a tubos blanco; 75 μ l de Fru1,6P₂ 2 μ M a tubos estándar; 75 μ l de muestra a tubos problema; agitar con vórtex y leer fluorescencia; 10 μ l de Gli3PDH diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 15 min en oscuridad y leer fluorescencia. El aumento de la fluorescencia indica la concentración de Gli3P; 10 μ l de TPI diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 15 min en oscuridad y leer fluorescencia. El aumento de la fluorescencia indica la concentración de DHAP; 10 μ l de aldolasa diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 15 min en oscuridad y leer fluorescencia. El aumento de la fluorescencia indica la concentración de Fru1,6P₂.

2.13.-Determinación de proglucógeno (PG) y macroglucógeno (MG).

2.13.1.-Extracción de PG y MG.

El método utilizado para la extracción de las fracciones PG y MG a partir de una hidrólisis ácida se basa en métodos descritos previamente (Alonzo et al., 1995; Lomako et al., 1991; Lomako et al., 1993; Jansson, 1981). Una vez digerido el tejido, el glucógeno se encuentra en la forma de residuos de glucosa, que es el metabolito que se valora. En breve el método consiste en: 15 a 25 mg de músculo pulverizado en tubos Eppendorf; 200 µl de PCA 1.5 M y se homogeniza con pistilo teflón, en agua-hielo; 20 min reposo en agua-hielo; centrifugar a 3.000 rpm a 4° C, por 15 min; 100 µl sobrenadante a tubo Eppendorf marcado MG, resto a tubo marcado GL (glucosa) y dejar en agua-hielo. En tubo PG, donde está pellet, escurrir líquido y secar paredes cuidadosamente; 650 µl de HCl 2 N a tubos MG y PG. Tubo MG agitar con vórtex y con pistilo teflón homogenizar pellet de tubo PG; tubos MG y PG a 100° C en seco, por 2 h; 650 µl de NaOH 2 N a tubos MG y PG para neutralizar a pH 7, agregar NaOH 2 N extra para ajuste exacto; en los extractos se valora de inmediato PG, MG y GL o se almacenan a -40° C para valoración posterior.

2.13.2.-Solución estándar.

Se prepara una solución de glucosa 500 µM. La glucosa se pesa en balanza analítica, se hace la dilución, se reparte en alícuotas en tubos Eppendorf y se congelan a -40° C. Cada vez que se usa una solución el resto se desecha.

2.13.3.-Fundamento (Lowry & Passoneau, 1972).

- 1) Glucosa + ATP → (HK) → Glc6P + ADP
- 2) Glc6P + NADP⁺ → (G6PDH) → 6Pgluconato + NADPH + H⁺

2.13.4.-Reactivos y enzimas.

Tampón Tris 1 M, pH 8.1; MgCl₂ 1 M; DTT 0.5 M; ATP 300 mM; NADP 50 mM; G6PDH 350 U/ml; HK 280 U/ml (diluída para 0.14 U/ml; 1 ml de cóctel + 25 µl de HK).

2.13.5.-Preparación del cóctel o mezcla de reacción.

Se prepara el cóctel que contiene los siguientes reactivos y enzimas, a las concentraciones finales indicadas: Tampón Tris 150 mM pH 8.1; MgCl₂ 1 mM; DTT 0.5 mM; ATP 300 µM; NADP 50 µM; ajustar a pH 8.1; G6PDH 0.035 U/ml.

2.13.6.-Preparación del ensayo Fluorímetro excitación 340 nm, emisión 465 nm, 500 V.

3 tubos blanco, 3 tubos estándar y 2 tubos problema; 1 ml de cóctel a todos los tubos; 10 µl de agua destilada a tubos blanco; 10 µl de de Glucosa 500 µM a tubos estándar; 10 µl de muestra MG, PG y GL a tubos problema; agitar con vórtex y leer fluorescencia; 25 µl de HK diluída a todos los tubos; agitar con vórtex, 60 min en oscuridad y leer fluorescencia. El aumento de la fluorescencia en los tubos marcados MG, PG y GL indica la concentración de glucosa.

2.14.-Protocolo para obtener fracción microsomal y subfracciones de retículo sarcoplasmático.

Los músculos fueron procesados de acuerdo a Saito (**Saito et al., 1984**) con modificaciones.

El músculo pulverizado se coloca en vaso de homogenizador (Du Pont Instruments, Sorvall ® Omni Mixer), se agrega tampón Tris-HCl 0.1 M pH 8.6 en una relación de 5 ml/g de músculo y se agrega BHT 0.5 % en una relación de 50 µl/ml de tampón Tris-HCl; con el vaso sumergido en agua-hielo, se homogeniza a 10.000 rpm durante 15 s por 4 veces, con 15 s de reposo entre cada vez; el homogenizado (H) se coloca en tubo de centrifuga (Du Pont Instruments, Sorvall RC5C ®) y se centrifuga a 8.030 rpm (7.700 g) por 10 min; el sobrenadante (S1) se filtra a través de gasa triple y se coloca en tubo de ultracentrifuga, en agua-hielo. En este sobrenadante se encuentran vesículas de baja densidad del sarcolema, túbulos T y fragmentos de retículo sarcoplasmático, especialmente túbulos longitudinales; el pellet que queda después de centrifugar a 7.700g (P1) se resuspende en el mismo volumen inicial de tampón Tris-HCl 0.1 M pH 8.6, sin agregar BHT 0.5 %, y se rehomogeniza a 10.000 rpm durante 15 s por 4 veces, con 15 s de reposo entre cada vez; el rehomogenizado (H) se coloca en tubo de centrifuga (Du Pont Instruments, Sorvall RC5C ®) y se centrifuga a 8.030 rpm (7.700 g) por 10 min; el sobrenadante (S2) se filtra a través de gasa triple y se coloca en otro tubo de ultracentrifuga. El pellet se desecha. En este sobrenadante se encuentran tríadas, cisternas terminales y vesículas de retículo sarcoplasmático (de aquí se obtendrá el pellet 2 del músculo después de la ultracentrifugación); se taran los tubos de la ultracentrifuga; se ultracentrifuga a 25.300 rpm (100.000 g) por 1 h 30 min a 4° C (Beckman, rotor SW41Ti); el sobrenadante se desecha y los pellet (fracción microsomal 1 y fracción microsomal 2, FM1 y FM2) se resuspenden en 500 µl de tampón Tris-HCl 0.1 M pH 8.6. Los 500 µl de tampón para resuspender los pellet resultó ser el volumen adecuado para lograr buenas lecturas en la determinación de MDA y proteínas totales, teniendo en cuenta pesos de músculo de entre 0.9 y 1.9 g.

2.15.-Protocolo para la valoración de proteínas totales.

2.15.1.-Reactivos.

BSA 10 %; Reactivo A (3 g de Na₂CO₃ + 0.4 g de NaOH, hasta 100 ml agua destilada); Reactivo B (Sulfato cúprico 2 %); Reactivo C (Tartrato sódico-potásico x 4 H₂O 4 %); Reactivo ABC fresco (100 volúmenes de A +

1 volumen de B + 1 volumen de C); Reactivo de Folin fresco (1 volumen de reactivo de Folin + 2 volúmenes de agua destilada).

2.15.2.-Curva de calibración con estándar BSA 10 % (10 mg/10 ml agua destilada).

| | | | | | |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| BSA 10 % (µl) | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| Agua destilada (µl) | 200 | 150 | 100 | 50 | 0 |
| Concentración (mg/ml) | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |

2.15.3.-Preparación del ensayo.

1 tubo blanco, 5 tubos estándar, tubos muestra; 250 µl de agua destilada a tubo blanco; 250 µl de BSA estándar a tubos 1-2-3-4-5; 25 µl de muestra + 225 µl de agua destilada a tubos muestra; 2.5 ml de reactivo ABC a todos los tubos; Agitar con vórtex, 15 min a temperatura ambiente; 250 µl de reactivo Folin diluido a todos los tubos; Agitar con vórtex, 10 min a temperatura ambiente; Leer a 660 nm en espectrofotómetro.

2.16.-Protocolo para la valoración de MDA (Visioli, 1997).

2.16.1.-Reactivos.

Tampón Tris-HCl 0.1 M pH 8.6 a 25° C; BHT 0.5 % fresco (10 mg BHT + 20 ml metanol); TBA 0.67 % fresco (67 mg TBA + 0.5 ml NaOH 1 N + 9.5 ml agua destilada); TCA 40 % fresco (1 g TCA + 2.5 ml agua destilada); TEP madre (120 µl TEP + HCl 0.01 M hasta 50 ml; incubar a 50° C durante 1 h, guardar en botella oscura a 4° C).

2.16.2.-Curva de calibración con estándar TEP.

| | | |
|-----------------|--|-------------------|
| 25 µl TEP madre | + 2.500 µl agua destilada. | Concentración |
| 250 µl de a) | + 2.250 µl agua destilada + 100 µl BHT | (E5 = 720 ng/ml). |
| 500 µl de b) | + 500 µl agua destilada + 25 µl BHT | (E4 = 360 ng/ml). |
| 500 µl de c) | + 500 µl agua destilada + 25 µl BHT | (E3 = 180 ng/ml). |
| 500 µl de d) | + 500 µl agua destilada + 25 µl BHT | (E2 = 90 ng/ml). |
| 500 µl de e) | + 500 µl agua destilada + 50 µl BHT | (E1 = 45 ng/ml) |

Nota.-BHT 0.5 % se agrega al final por regla 50 µl/ml. Ejemplo.-De E5 se toman 500 µl para E4, por lo tanto en E5 quedan 2.000 µl, entonces se agrega 100 µl de BHT.

2.16.3.-Preparación del ensayo.

1 tubo blanco, 5 tubos estándar (E1-E5), tubos muestra; 200 µl tampón Tris-HCl 0.1 M pH 8.6 a tubo blanco + 10 µl BHT; 200 µl de E1-E5 a tubos estándar; 200 µl de muestra a tubos muestra + 10 µl BHT; 200 µl de TCA 40 % a todos los tubos; 800 µl de TBA a todos los tubos; Incubar a 100° C baño maría, 15 min, enfriar con agua; 400 µl de ácido acético glacial directo de botella a todos los tubos; 800 µl de cloroformo directo de botella a todos los tubos; Agitar con vórtex; Centrifugar a 3.000 rpm (1.700 g), 30 min; Se forman dos fases, no agitar; Con pipeta Pasteur extraer fase superior y colocar en cubeta de cuarzo pequeña; Leer a 530 nm en espectrofotómetro.

2.17.-Obtención de músculo para aislar fracciones de RS mediante gradiente de sacarosa.

Se extraen tibial anterior no estimulado (control) y tibial anterior estimulado. Los grupos elegidos, según resultados de los metabolitos, fueron 0 min (control), 15', 15'30', 30' y 30'3h.

Antes de finalizar la estimulación se exponen ambos tibiales anteriores mediante cirugía muy cuidadosa dejando intacto nervios, vasos sanguíneos, tejido conectivo y tendón. Completados los tiempos descritos anteriormente se aíslan los músculos, se extraen rápidamente y se guardan en hielo. Se inicia de inmediato el procedimiento conducente a la obtención de fracción microsomal y subfracciones de retículo sarcoplasmático (procedimiento en punto 2.14).

2.17.1.-Preparación del músculo para aislar fracciones de RS (Saito et al., 1984).**2.17.2.-Preparación de reactivos y drogas.**

Tampón Imidazol-HCl 5 mM pH 7.4 (almacenado a 4° C); Tampón Imidazol-HCl 5 mM pH 7.4 más Sacarosa 0.3 M (fresco); Inhibidores de proteasas: Aprotinina (Sigma A-1153) (5 mg/ml agua bidestilada), Benzamidina (Sigma B-6506) (0.1 M, en agua bidestilada), Leupeptina (Sigma L-8511) (5 mg/ml agua bidestilada), Pepstatina (Sigma P-5318) (0.45 mg/ml alcohol etílico 50%), PMSF (Sigma P-7626) (0.1 M, en alcohol isopropílico). Preparados los inhibidores se alicuotean en tubos Eppendorf en cantidades adecuadas según necesidad para cada músculo y se congelan a -40° C; Sacarosa 65 % w/w en tampón Imidazol-HCl 5 mM pH 7.4; Para preparar las fases del gradiente de Sacarosa se procede según se indica en el cuadro:

| Sacarosa 65 % | Imidazol-HCl 5 mM, pH 7.4 | Sacarosa | Fases gradiente |
|----------------------|--------------------------------------|-----------------|------------------------|
| (ml) | (ml) | % | (ml) |
| A | B | C | D |
| 3.32 | 4.68 | 27 | 2.4 |
| 3.94 | 4.06 | 32 | 2.4 |
| 4.18 | 3.81 | 34 | 2.4 |
| 4.68 | 3.32 | 38 | 2.4 |
| 3.46 | 1.54 | 45 | 1.4 |

Al volumen de A se agrega el volumen de B lo que da lo indicado en la columna C, posteriormente se ajusta el % de Sacarosa mediante refractómetro en donde en general se necesitó agregar una cierta cantidad de Imidazol-HCl 5 mM pH 7.4 para ajustarse a los valores indicados en la columna C. Se prepara justo antes de usarlas.

2.17.3.-Preparación de músculo y pellet para gradiente de sacarosa.

- 1.-El músculo se lava con tampón Imidazol-HCl 5 mM pH 7.4 más Sacarosa 0.3 M, se seca, se corta tendón, se pesa y se trocea.
- 2.-Se homogeniza a 10.000 rpm durante 15 s por 4 veces, con 15 s de reposo entre cada vez, en tampón Imidazol-HCl 5 mM pH 7.4 más Sacarosa 0.3 M, en una relación de 5 ml/g de músculo fresco; se agregan inhibidores de proteasas en una relación de 1 µl de Aprotinina, 64 µl de Benzamidina, 5 µl de Leupeptina, 12 µl de Pepstatina y 20 µl de PMFS por cada 10 ml de tampón Imidazol-HCl-sacarosa.
- 3.-El homegoenizado se centrifuga a 8.030 rpm (7.700 g), durante 10 min a 4° C.
- 4.-El sobrenadante (S1) se filtra a través de gasa triple y se coloca en tubo de ultracentrífuga, en hielo.
- 5.-El pellet (P1) se resuspende en el mismo volumen inicial de tampón Imidazol-HCl 5 mM pH 7.4 más Sacarosa 0.3 M más inhibidores de proteasas y se rehomogeniza.
- 6.-El rehomogenizado de P1 se centrifuga a 8.030 rpm (7.700 g), durante 10 min a 4° C.
- 7.-El sobrenadante (S2) se filtra a través de gasa triple y se coloca en otro tubo de ultracentrífuga, en hielo.
- 8.-Se taran los tubos de la ultracentrífuga.
- 9.-Se ultracentrifuga a 25.300 rpm (100.000 g), durante 1 h 30 min, a 4° C.
- 10.-Se desecha el sobrenadante y los tubos se colocan invertidos sobre papel secante; los pellets son la fracción microsomal 1 y fracción microsomal 2 (FM1 y FM2). Se agrega a cada tubo 150 µl de tampón Imidazol-HCl 5 mM pH 7.4 más Sacarosa 0.3 M, con pistilo de vidrio se resuspenden y se rehomogeniza. Los 300 µl de rehomogenizado se mantienen en hielo hasta cargarlos en el gradiente de sacarosa.

- 11.-A partir de estas fracciones microsomales crudas, se continúa el protocolo para obtener subfracciones de RS de mayor pureza, mediante gradientes discontinuos de sacarosa.
- 12.-Se monta el gradiente de sacarosa (27-32-34-38 y 45 %) en tubos ultraclear.
- 13.-Se depositan los 300 μ l del rehomogenizado (FM1+FM2) sobre la sacarosa 27 %, se remueve suavemente para mezclar con la sacarosa.
- 14.-Se centrifuga a 20.200 rpm (70.000 g), a 4° C, 12 a 14 h.
- 15.-Se fotografian los tubos.

Fracciones

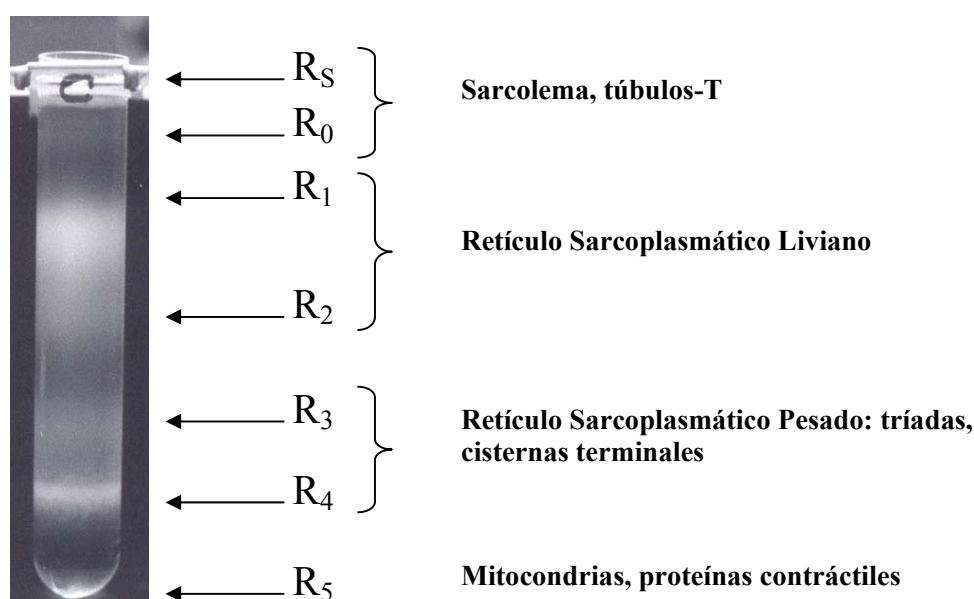


Figura 2.7.-Se muestra el resultado de un gradiente discontinuo de sacarosa de tibial anterior control. Las bandas son R_S (material flotante) y R_0 a R_5 que corresponde a fracciones desde la menos densa a la más densa (Frías et al., 2005)

2.18.-Protocolo para el registro del test de fatiga muscular.

Se usó un grupo separado de animales para la medición de generación de fuerza isométrica. El implante de electrodos y estimulación se realiza según lo relatado en puntos 2.1 y 2.2. Se aísla el tendón distal del músculo tibial anterior y se amarra. La extremidad se fija a la mesa de registro mediante brocas colocadas en partes distales de fémur y tibia. El tendón se amarra al transductor de tensión. Se ajusta la alineación del músculo con respecto del transductor. Se busca el largo ideal del músculo para registrar la mejor fuerza de contracción, relación longitud/tensión. Para registrar la fatiga muscular se usa el protocolo de Burke (**Burke et al., 1973**),

consiste en estimular con 40 Hz durante 330 ms en cada s durante 2 min. Para el registro se utilizó el programa CALIGRAF. Los datos del registro se guardaron en EXCEL para la creación gráfica. De la gráfica resultante se calcula la tensión inicial (T_i) y final (T_f) en gramos. Se calculó el cociente T_i/T_f que representa un índice de fatiga. Las tensiones se ajustan a gramo de tejido fresco (gTF), para ello terminado el registro se extrae el músculo completo y se pesa rápidamente.

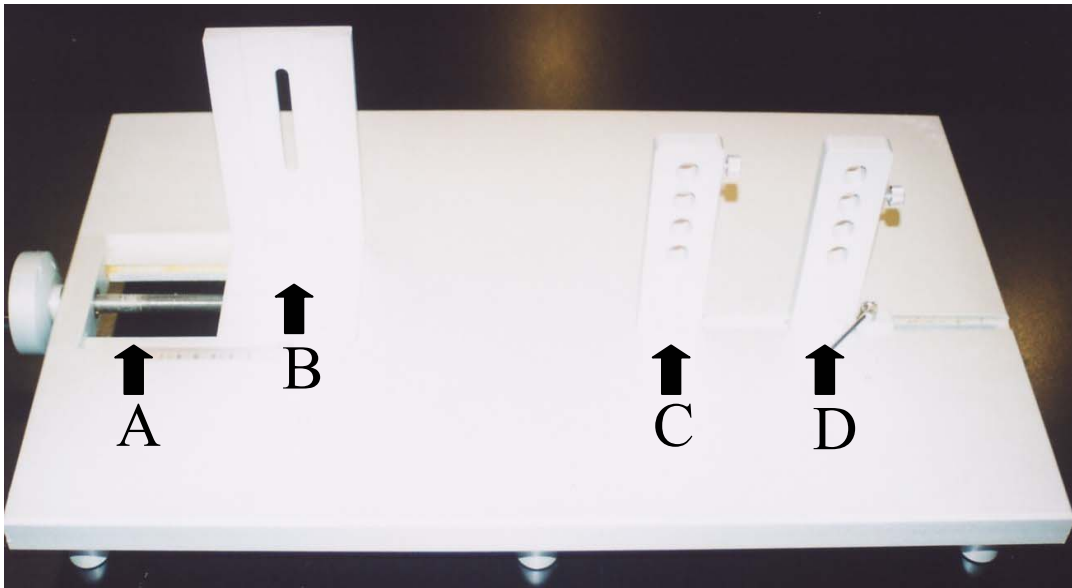


Figura 2.8.-Mesa para registro de contracción muscular. (A) tornillo para ajustar largo de músculo, (B) soporte para el transductor con regulación de altura, (C) soporte para broca de tobillo con regulación de altura, (D) soporte para broca de rodilla con regulación de altura, con movimiento lateral para ajustar largo tobillo-rodilla. Los portabroca de acero que se instalan en C y D se desplazan lateralmente.



Figura 2.9.- Fijación de la extremidad a la mesa de registro y amarre al transductor de tensión.



Figura 2.10.-Detalle del transductor de tensión.

2.19.-Protocolo para estudio de la respuesta motora directa (onda M).

Para la anestesia se utiliza protocolo descrito en punto 2.1 (Flecknell, 1987). Se implanta electrodo de estimulación bipolar de platino en nervio peroneo. En músculo tibial anterior se implantan electrodos de registro (Grass) insertados longitudinalmente, en el mismo lugar y a la misma profundidad. Electrodo de tierra (Grass) se inserta en músculo bíceps femoral en el mismo lugar en todos los músculos. Los electrodos de estimulación se conectan a unidad aisladora de estímulos (Grass, SIU5A) y a estimulador (Grass, S88D). Los electrodos de registro y tierra se conectan a preamplificador A.C. (Grass, P511J) y a osciloscopio de doble barrido (Tektronix, 5112). El nervio se estimula a 1 Hz, duración de pulso de 0.15 ms y con voltaje suficiente para reclutar todos los axones motores. Se verifica que la polaridad de la estimulación sea cátodo distal. La amplitud del registro se lee en pantalla del ORC y se transforma a mV mediante calibración con el preamplificador. El registro de la onda M y señal de calibración se realizó con la misma sensibilidad en preamplificador y osciloscopio y, se mantuvo los filtros de baja y alta frecuencia. Los registros de la onda M se caracterizaron por ser muy estables. Los registros se realizaron en músculos de grupos control (C), 5', 5'30', 15', 15'30', 30' y 30'3h.

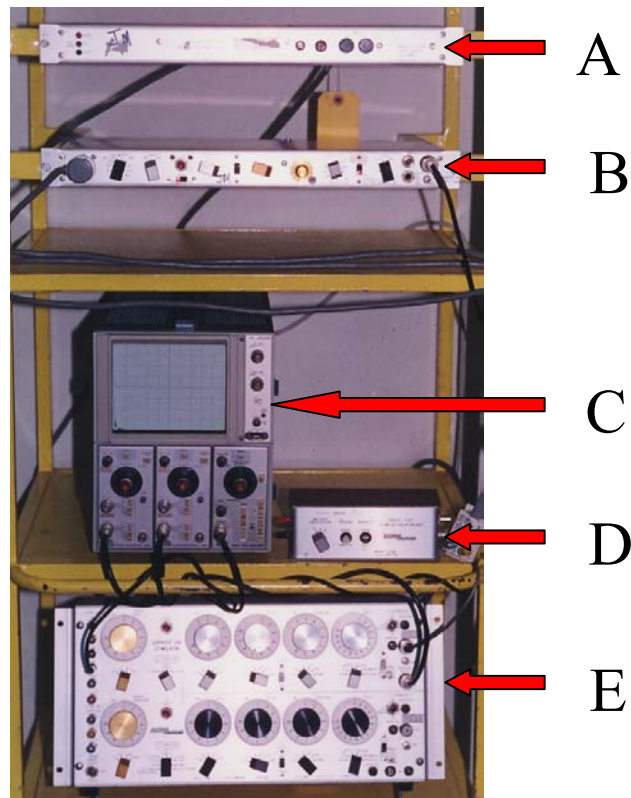


Figura 2.11.-Equipos de electrofisiología. (A) fuente poder de preamplificador, (B) preamplificador, (C) osciloscopio, (D) unidad aisladora de estímulos, (E) estimulador.

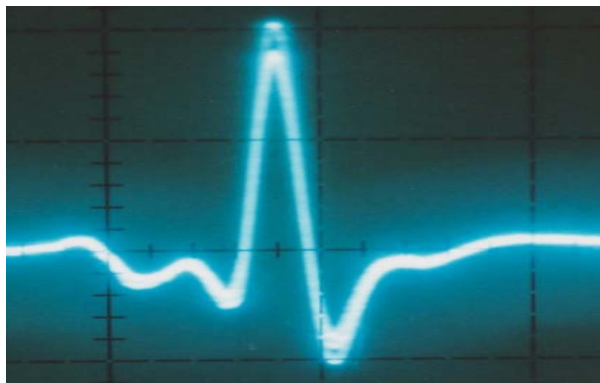


Figura 12.-Potencial de acción compuesto u onda M registrada en músculo tibial anterior control.

2.20.-Análisis estadístico.

Se calculó promedios y desviación estándar (promedio \pm DE), para fatiga muscular se calculó error estándar de la media (EEM). Para diferencias significativas ($p < 0.05$) se utilizó ANOVA y prueba de Newman-Keuls para comparar medias.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS ONDA M

Tabla 3.1.-Amplitud de onda M (promedio \pm DE), n entre paréntesis.

| GRUPO | Control | 5' | 5'+30'd | 15' | 15'+30'd | 30' | 30'+3hd |
|-------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| (mV) | 15,8 \pm 3,2 (6) | 4,4 \pm 1,2 (2) *** | 6,1 \pm 0,8 (2) ** + | 5,3 \pm 0,4 (2) ** | 8,1 \pm 1,7 (2) * + | 5,0 \pm 1,5 (3) *** | 5,4 \pm 1,8 (3) *** + |

Valor de P respecto del grupo control * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001

Respecto del grupo control, la amplitud de la onda M disminuyó significativamente con los tres tiempos de estimulación (72,2 - 66,5 y 68,4 % respectivamente). Con los tiempos de descanso la amplitud de la onda M no recuperó el valor del grupo estimulado y menos aún el valor del grupo control (**Figura 3.1**). Respecto de Hicks (**Hicks et al., 1997**) hay un comportamiento similar, en ellos a los 5 min de estimulación de músculo control la amplitud de la onda M se reduce en aproximadamente 4 veces; en nuestro caso disminuyó de 15,8 a 4,4 mV, es decir 3,6 veces. El siguiente registro lo tienen a los 10 min, en donde la amplitud disminuye en 5,6 veces aproximadamente; en nuestro caso el siguiente registro está a los 15 min y la disminución es de 3 veces aproximadamente.

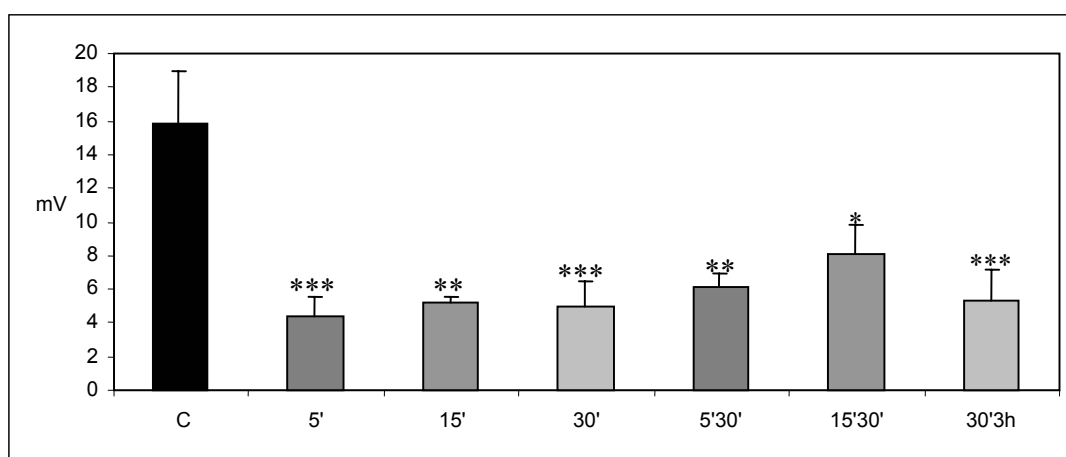


Figura 3.1.-Amplitud de onda M de músculo control, estimulado y con descanso (promedio \pm DE) (barra negra es control).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS FATIGA MUSCULAR

La tensión inicial de los grupos estimulados decae progresivamente en la medida que aumenta el tiempo de estimulación (B a D), sin embargo, en el grupo 30'3h (E) la tensión inicial se recupera e incluso está levemente por sobre la del músculo control. En la tensión final también se observa un decaimiento, más leve que el de la tensión inicial; nuevamente, se observa que la tensión final del músculo 30'3h (E) se recupera casi al nivel del músculo control. En F se muestra un registro de músculo sóleo control en donde destaca las menores tensiones inicial y final que desarrolla respecto del músculo tibial anterior control (Figura 4.1).

Figura 4.1.-Registros de fatiga de músculo tibial anterior control (A), 1'30' (B), 5'30' (C), 15'30' (D), 30'3h (E) y sóleo control (F).

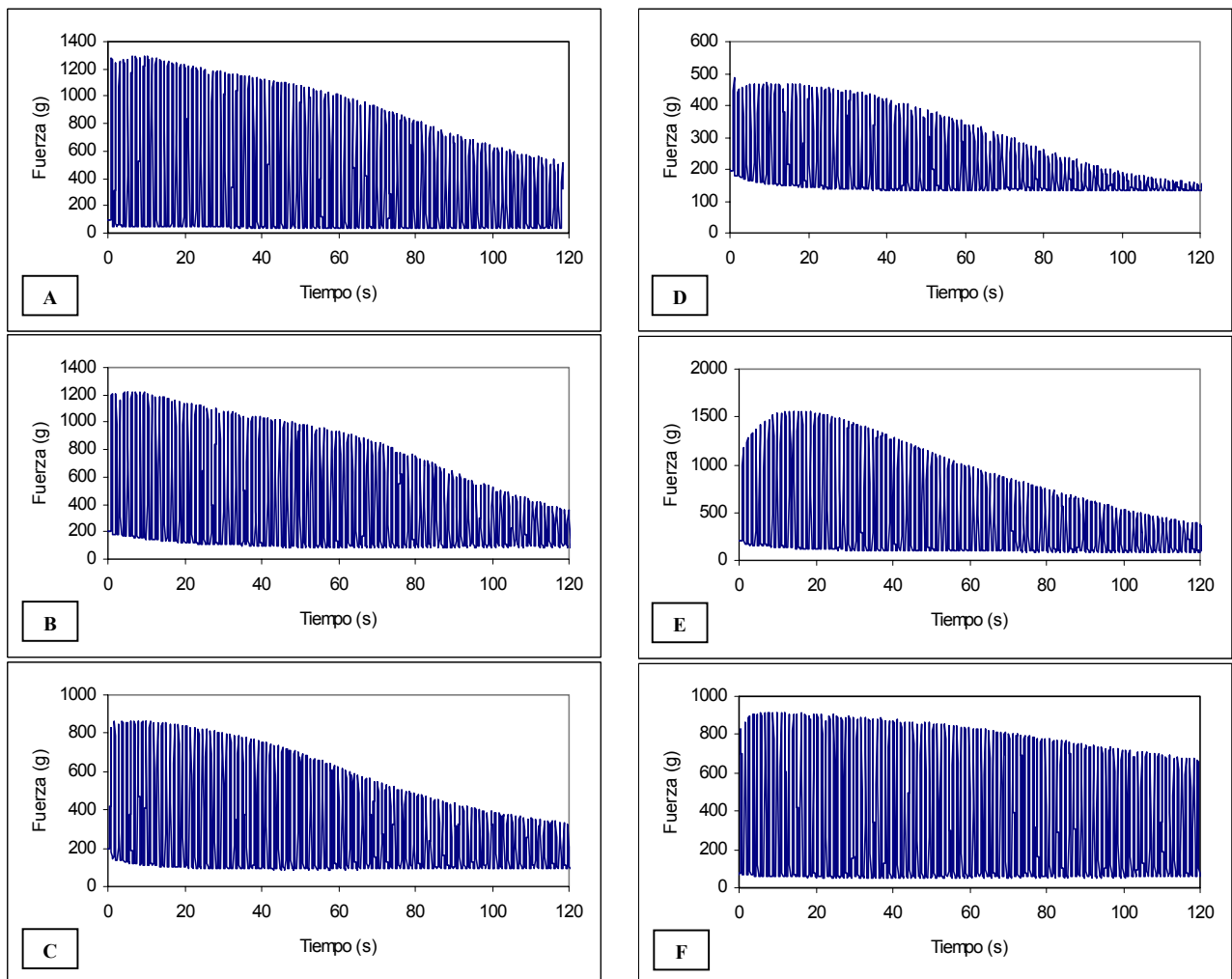


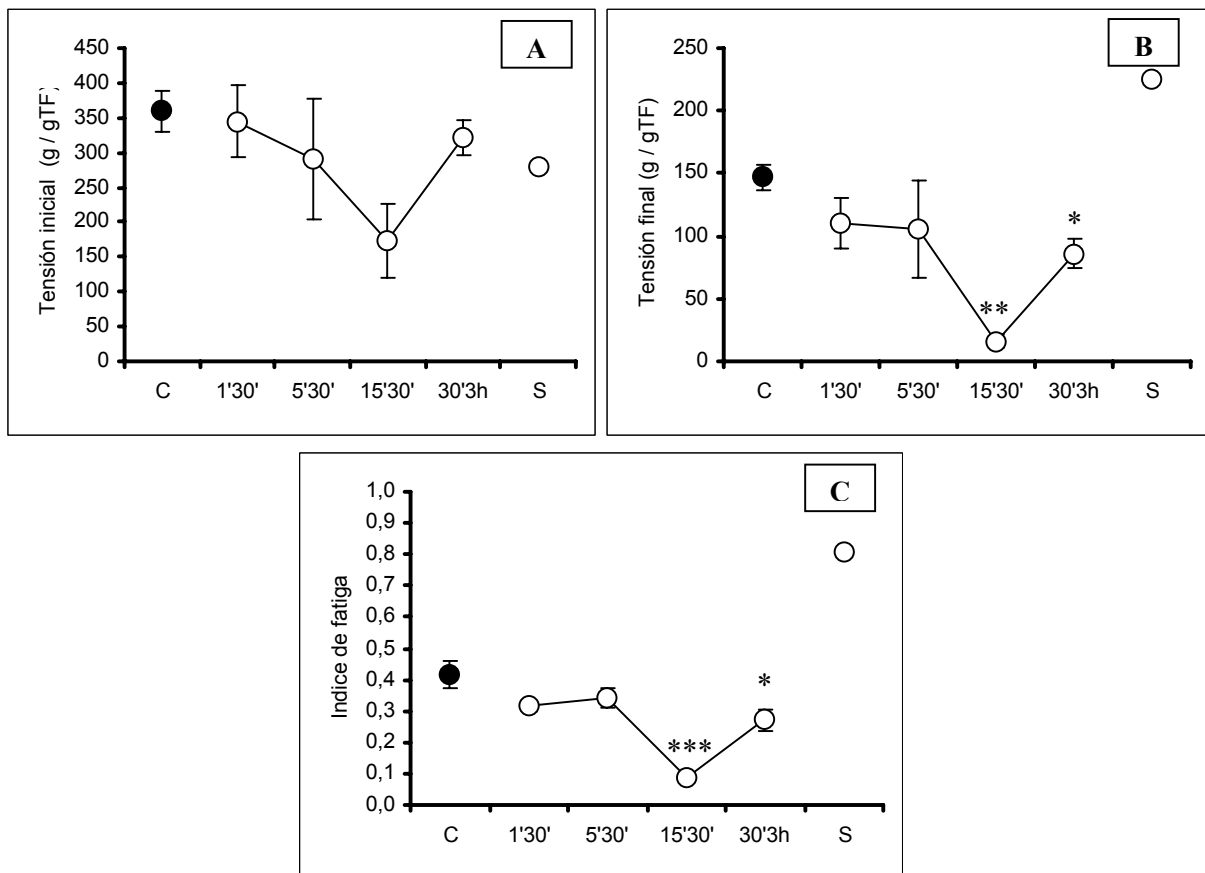
Tabla 4.1.-Ti_g, Tf_g e IF de grupo control y estimulados más descanso (promedio ± EEM).

| Grupo | Tig / gTF | Tfg / gTF | IF |
|------------|--------------|------------------|--------------------|
| C (4) | 359,8 ± 29,6 | 146,8 ± 9,4 | 0,41 ± 0,04 |
| 1'30' (3) | 375,8 ± 48,5 | 111,9 ± 14,5 | 0,30 ± 0,02 |
| 5'30' (3) | 291,7 ± 86,7 | 105,2 ± 39,0 | 0,34 ± 0,03 |
| 15'30' (3) | 174,0 ± 53,7 | 16,0 ± 5,8 ** | 0,09 ± 0,00 *** |
| 30'3h (3) | 320,8 ± 25,7 | 86,2 ± 11,3 | 0,27 ± 0,03 * |
| Sóleo (1) | 279,6 | 225,6 | 0,81 |

Valor de P respecto del grupo control * P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001

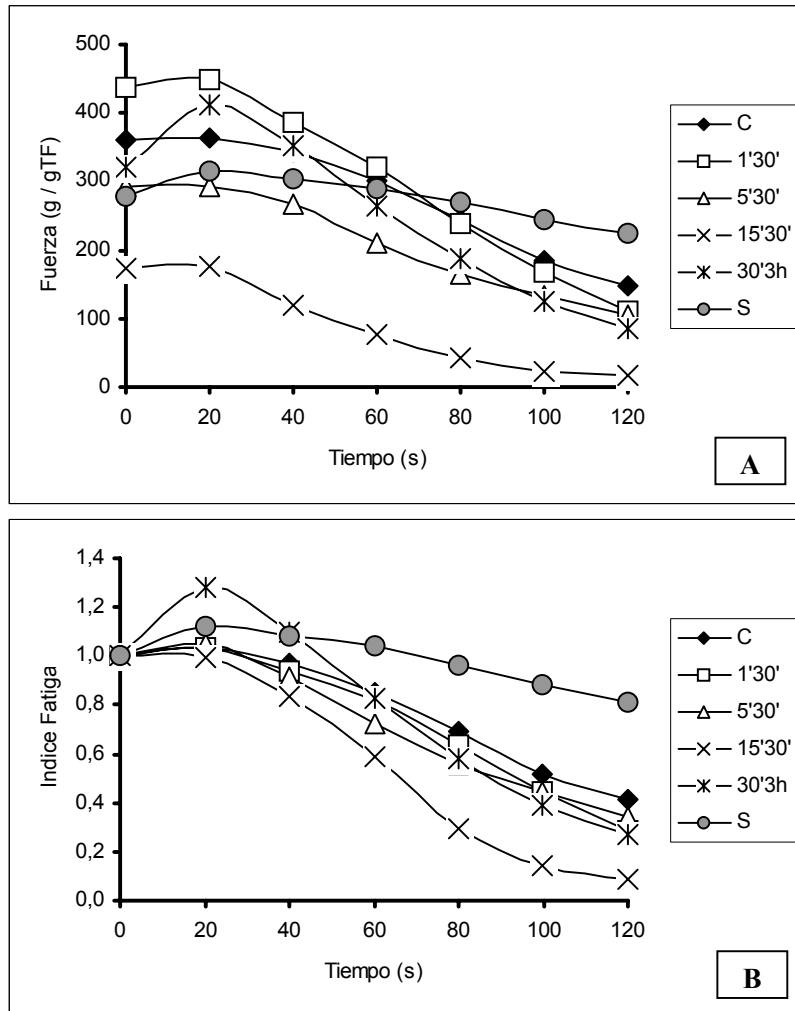
Respecto del grupo control la tensión inicial no experimentó modificaciones significativas, la tensión final disminuyó significativamente en 89,1 % en el grupo 15'30'. El índice de fatiga disminuyó significativamente en 78,0 % en el grupo 15'30' y en 34,1 % en el grupo 30'3h (Tabla 4.1 y figura 4.2).

Figura 4.2.-Tensión inicial (A), final (B) e índice de fatiga (C) de músculo TA y sóleo (S) sometido a prueba de fatiga (promedio ± EEM) (círculo negro es control).



En la figura 4.3 se muestra la evolución temporal, durante la prueba de fatiga de Burke, del desarrollo de fuerza (A) y del índice de fatiga (B) en los músculos TA y en el sóleo.

Figura 4.3.-Evolución de la fuerza (A) e índice de fatiga (B) cada 20 segundos en músculo tibial anterior y sóleo (S) durante prueba de fatiga.



Respecto del grupo control pero también de los otros grupos estimulados, se observa que el grupo 15'30' fue el que desde el principio muestra una mayor caída en el desarrollo de fuerza. En cuanto al índice de fatiga, el grupo 15'30' también muestra una mayor caída en este valor.

Además, se nota que las tres horas de descanso que se dió al grupo estimulado durante 30 minutos producen al principio un mayor desarrollo de fuerza y por ende un valor mayor del índice fatiga (Figura 4.3).

CAPÍTULO 5

RESULTADOS GRADIENTE SACAROSA DE RS

El análisis de las fotografías muestra una serie de bandas, según trabajo realizado por Frías (Frías et al, 2004) las fracciones del gradiente son R_S (material flotante) y R_0 que contienen membranas de sarcolema y de túbulos T, R_1 y R_2 que contienen RS ligero, R_3 y R_4 que contienen RS pesado, tríadas, cisternas terminales y R_5 que contiene mitocondrias, proteínas contráctiles; los componentes celulares se distribuyen desde los menos a los más densos. De los experimentos realizados con grupos 1'30', 5'30', 15', 15'30', 30' y 30'3h, no se encontró diferencias en la distribución y grosor del bandeo respecto del control y tampoco entre los diferentes tiempos de estimulación o estimulación más descanso (Figura 5.1).

Figura 5.1.-Gradiente de sacarosa de fracciones de RS de músculo tibial anterior sometido a 30 minutos de estimulación más 30 minutos de descanso (E). C es control.

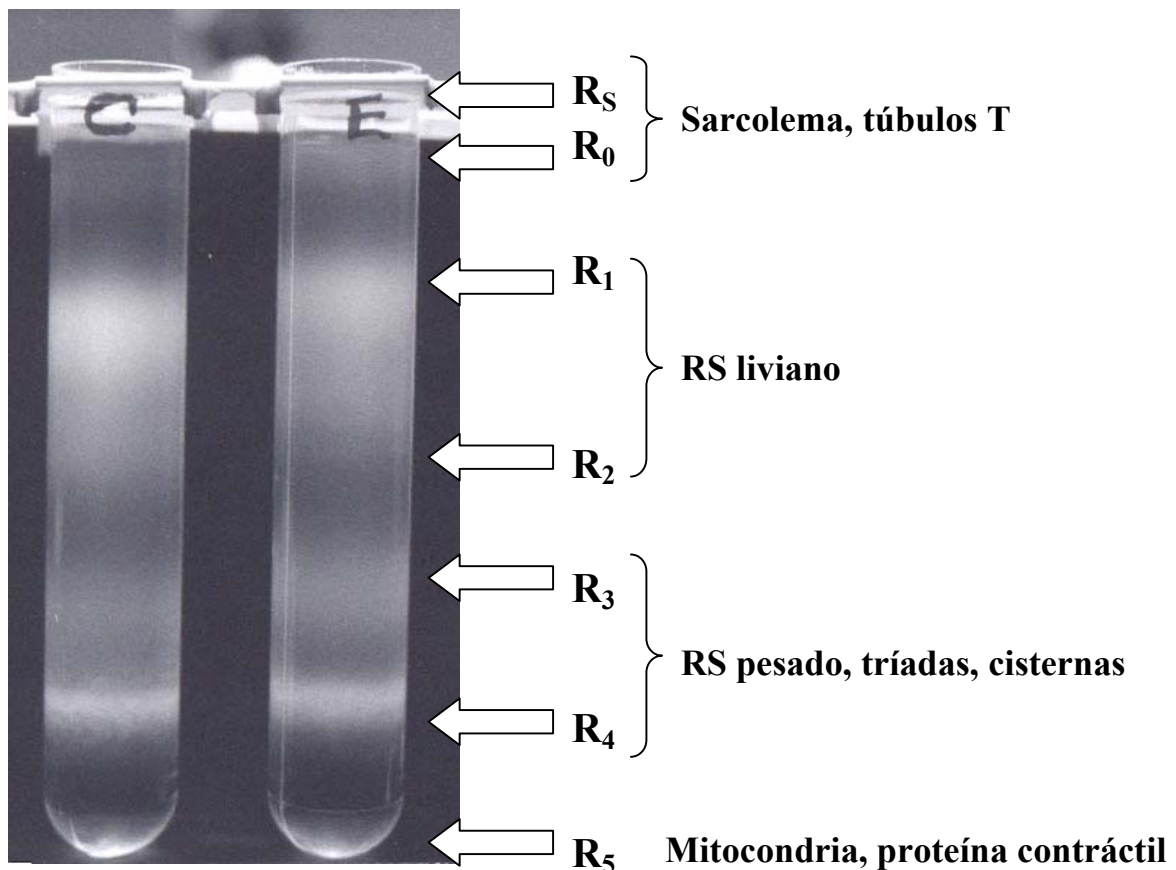
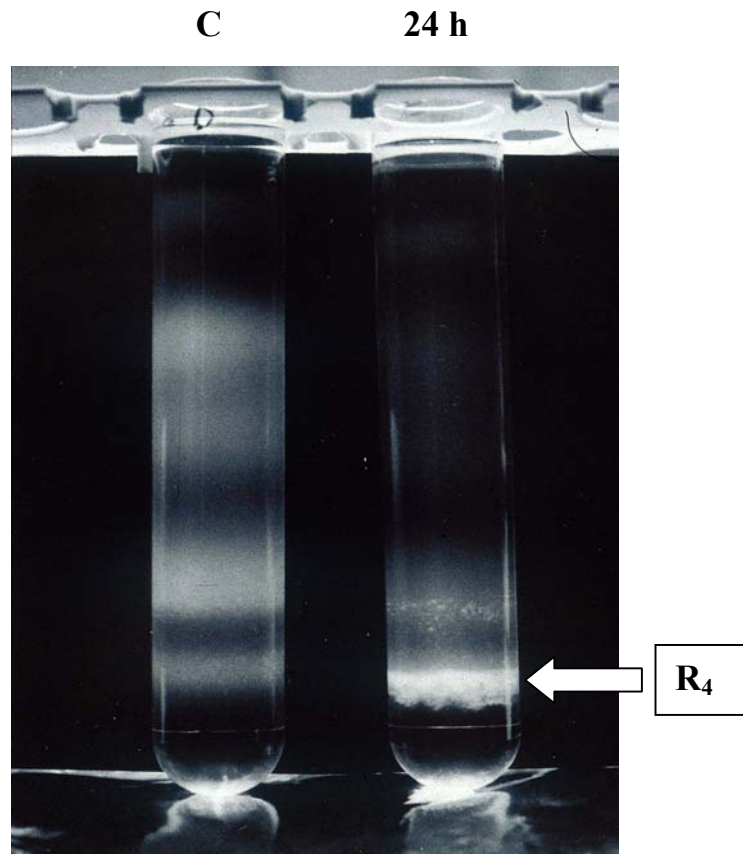


Figura 5.2.-Gradiente de sacarosa de fracciones de RS de músculo tibial anterior sometido a 24 horas de estimulación (E). C es control. (Tomado de Frías J). En este caso se observa un aumento en la banda R4, cuestión que no se observa en nuestros experimentos.



CAPÍTULO 6

RESULTADOS MALONDIALDEHÍDO

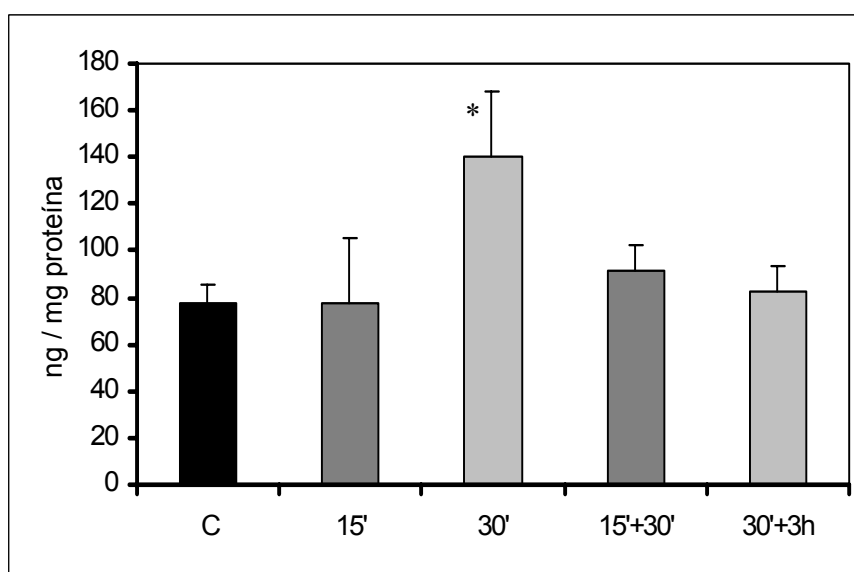
La finalidad de valorar MDA fue estudiar la peroxidación de lípidos de membrana de RS. La peroxidación ocurre normalmente, por ello se preparó pulverizado de músculo con y sin BHT, un antioxidante. En general, no hubo diferencias entre los músculos preparados con BHT y sin BHT, excepto entre los grupos control con y sin BHT donde sí hubo diferencia significativa ($P < 0,001$). Los datos que se muestran corresponden a los músculos tratados con BHT.

Tabla 6.1.-MDA (ng/mg proteína) en músculo TA con BHT (promedio \pm DE, n=4 todos)

| GRUPOS | MDA |
|---------|--------------------|
| Control | 78,0 \pm 7,5 |
| 15' | 77,3 \pm 28,5 |
| 15'30' | 91,7 \pm 10,9 |
| 30' | 140,5 \pm 27,5 * |
| 30'3h | 82,8 \pm 10,3 |

Respecto del grupo control en el grupo 30' hubo un aumento significativo (* $P < 0,05$; test Welch para DE distintas), el descanso no produjo modificación significativa (**Figura 6.1**).

Figura 6.1.-MDA en músculo TA procesado con BHT (promedio \pm DE) (barra negra es control).



CAPÍTULO 7

RESULTADOS METABOLITOS

En Tablas 7.1 A, B y C se muestran resultados para todas las situaciones experimentales.

Tabla 7.1.-ATP, PCr, creatina y creatina total de músculo estimulado (A), descansado (B) y con estimulación final (C) ($\mu\text{mol/gTF}$, promedio \pm DE).

| A | Control | 20'' | 1' | 5' | 15' | 30' |
|----------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| ATP | 6,9 \pm 0,6 (9) | 5,8 \pm 0,8 (7) | 3,5 \pm 0,3 (6) *** | 2,1 \pm 0,5 (6) *** | 3,1 \pm 0,6 (7) *** | 2,4 \pm 0,5 (6) *** |
| PCr | 19,9 \pm 2,4 (9) | 7,8 \pm 1,9 (7) *** | 4,2 \pm 1,3 (6) *** | 5,4 \pm 1,8 (6) *** | 10,3 \pm 1,6 (7) *** | 12,9 \pm 2,0 (6) *** |
| Creatina | 11,1 \pm 2,8 (9) | 24,5 \pm 4,6 (7) *** | 23,7 \pm 3,3 (6) *** | 18,2 \pm 1,9 (6) ** | 13,6 \pm 3,6 (7) | 10,9 \pm 3,2 (6) |
| Creatina total | 31,0 \pm 2,5 (9) | 32,3 \pm 4,1 (7) | 27,9 \pm 3,2 (6) | 23,6 \pm 0,7 (6) ** | 23,9 \pm 3,0 (7) ** | 23,8 \pm 3,9 (6) ** |

Valor de P respecto del grupo control ** P<0,01 *** P<0,001

| B | Control | 1'30' | 5'30' | 15'30' | 30'30' | 30'3h |
|----------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| ATP | 6,9 \pm 0,6 (9) | 5,0 \pm 1,0 (7) *** | 3,4 \pm 0,8 (7) *** | 3,3 \pm 1,0 (7) *** | 4,1 \pm 0,5 (3) *** | 4,0 \pm 0,5 (7) *** |
| PCr | 19,9 \pm 2,4 (9) | 19,9 \pm 0,9 (7) | 16,1 \pm 1,1 (7) | 16,4 \pm 1,5 (7) | 14,6 \pm 1,8 (2) | 19,3 \pm 4,0 (7) |
| Creatina | 11,1 \pm 2,8 (9) | 10,5 \pm 1,5 (7) | 8,2 \pm 1,8 (7) | 6,5 \pm 1,2 (7) | 11,8 \pm 1,2 (3) | 7,5 \pm 4,3 (7) |
| Creatina total | 31,0 \pm 2,5 (9) | 30,4 \pm 2,3 (7) | 24,3 \pm 2,1 (7) * | 22,9 \pm 1,7 (7) *** | 26,7 \pm 0,3 (2) | 26,9 \pm 8,0 (7) |

Valor de P respecto del grupo control * P<0,05 *** P<0,001

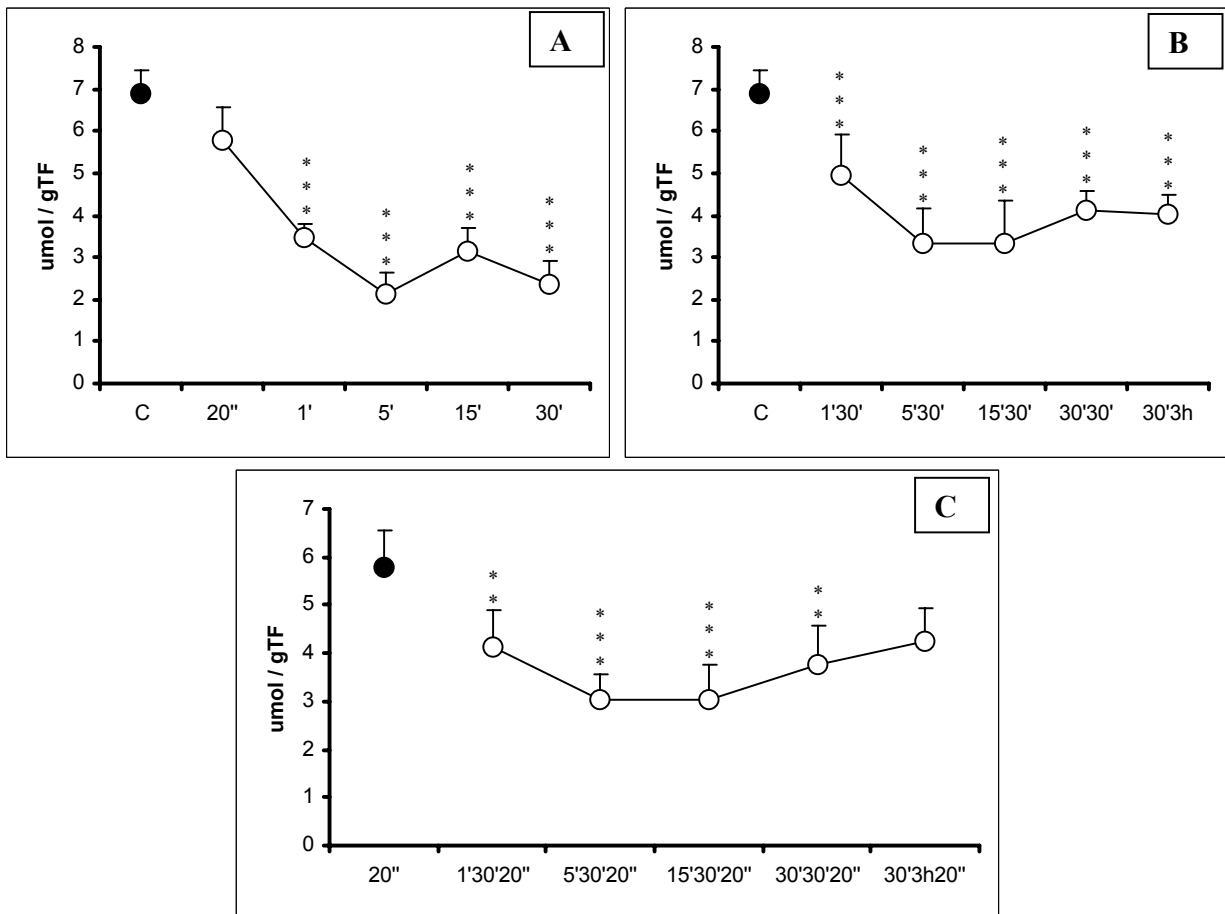
| C | 20'' | 1'30'20'' | 5'30'20'' | 15'30'20'' | 30'30'20'' | 30'3h20'' |
|----------------|-----------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| ATP | 5,8 \pm 0,8 (7) | 4,1 \pm 0,8 (7) ** | 3,0 \pm 0,5 (7) *** | 3,0 \pm 0,7 (7) *** | 3,8 \pm 0,8 (3) ** | 4,3 \pm 0,7 (4) |
| PCr | 7,8 \pm 1,9 (7) | 7,9 \pm 1,3 (7) | 11,9 \pm 1,8 (7) * | 11,6 \pm 2,0 (7) * | 15,6 \pm 1,5 (3) *** | 14,9 \pm 3,0 (4) *** |
| Creatina | 24,5 \pm 4,6 (7) | 20,8 \pm 4,7 (7) | 13,1 \pm 1,2 (7) *** | 12,0 \pm 2,9 (7) *** | 12,2 \pm 1,0 (3) *** | 14,6 \pm 3,8 (4) *** |
| Creatina total | 32,3 \pm 4,1 (7) | 28,7 \pm 3,7 (7) | 24,9 \pm 1,5 (7) ** | 23,6 \pm 2,0 (7) *** | 27,8 \pm 0,7 (3) | 29,5 \pm 2,1 (4) |

Valor de P respecto del grupo 20'' * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001

7.1.-Adenosintrifosfato (ATP).

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminuciones significativas desde 1 min en adelante en 49,3 – 69,6 – 55,1 y 65,2 %. Estos resultados son similares a los comunicados por otros autores (**Cadefau et al., 1993; Green et al., 1992**). Respecto del grupo control con el descanso ATP se mantuvo significativamente más bajo en todos los grupos en 27,5 – 50,7 – 52,2 – 40,6 y 42,0 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 1'30'20'' – 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'30'20'' en 29,3 – 48,3 – 48,3 y 34,5 % (Figura 7.1).

Figura 7.1.-ATP en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio ± DE).



7.2.-Cálculo del uso de ATP.

El uso anaeróbico del ATP se calcula a partir de los valores de ATP, ADP, PCr, lactato y piruvato de las muestras, antes e inmediatamente después de finalizar la estimulación, según ecuación propuesta (**Katz et al., 1986**). La ecuación es:

$$\text{Uso ATP} = 2 \times (-(\text{ATP}_f - \text{ATP}_i)) - (\text{ADP}_f - \text{ADP}_i) - (\text{PCr}_f - \text{PCr}_i) + 1,5 \times (\text{Lac}_f - \text{Lac}_i) + 1,5 \times (\text{Pir}_f - \text{Pir}_i)$$

Donde f, final; i, inicial.

Se obtienen dos fosfatos activos a partir de cada molécula de ATP utilizada y se produce 1,5 mmol de ATP por cada mmol de lactato y piruvato.

Tabla 7.2.-Uso de ATP en músculo estimulado (A), descansado (B) y con estimulación final (C) ($\mu\text{mol/gTF}$ promedio \pm DE, n entre paréntesis).

| A | 20'' | 1' | 5' | 15' | 30' | |
|---|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--|
| | 44,05 \pm 7,26 (7) | 67,68 \pm 9,57 (6) *** | 68,00 \pm 10,78 (6) *** | 32,32 \pm 2,32 (7) * | 23,26 \pm 3,31 (6) *** | |

Valor de P respecto del grupo 20'' * P<0,05 *** P<0,001

| B | 20'' | 1'30' | 5'30' | 15'30' | 30'30' | 30'3h |
|---|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | 44,05 \pm 7,26 (7) | 4,22 \pm 3,33 (7) *** | 10,84 \pm 3,34 (7) *** | 10,89 \pm 4,04 (7) *** | 12,13 \pm 7,74 (3) *** | 4,74 \pm 2,78 (6) *** |

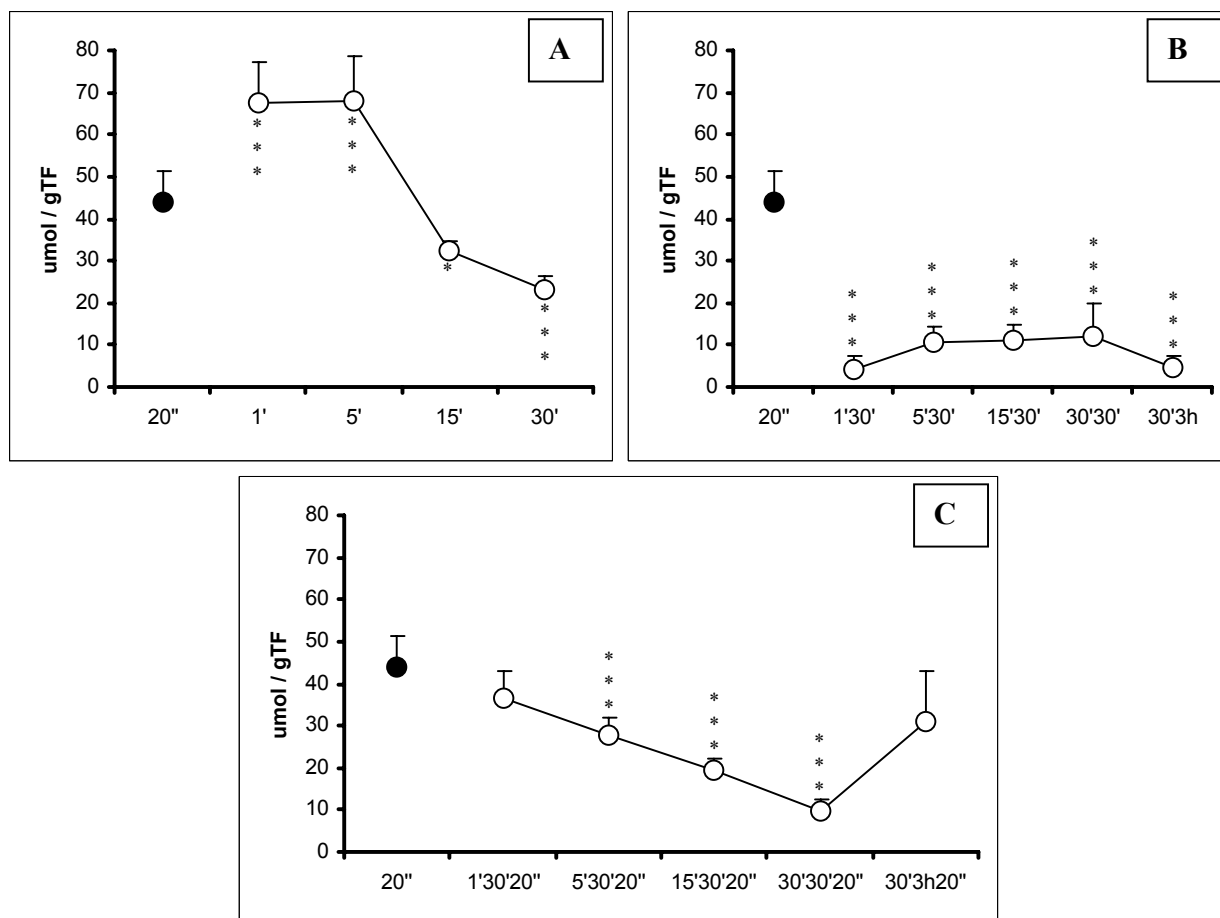
Valor de P respecto del grupo 20'' *** P<0,001

| C | 20'' | 1'30'20'' | 5'30'20'' | 15'30'20'' | 30'30'20'' | 30'3h20'' |
|---|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | 44,05 \pm 7,26 (7) | 36,43 \pm 6,67 (7) | 27,90 \pm 4,14 (7) *** | 19,29 \pm 2,68 (7) *** | 9,73 \pm 2,96 (3) *** | 30,94 \pm 12,24 (4) |

Valor de P respecto del grupo 20'' *** P<0,001

Respecto del grupo 20'' la estimulación produjo aumento significativo a 1 y 5 min en 53,6 y 54,4 %, luego disminuye significativamente a los 15 y 30 min en 26,6 y 47,2 %. Respecto del grupo 20'' con el descanso disminuyó significativamente en todos los grupos en 90,4 – 75,4 – 75,3 – 72,5 y 89,2 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'30'20'' en 36,7 – 56,2 y 77,9 % (Figura 7.2).

Figura 7.2.-Uso del ATP en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE).



7.3.-Cálculo del ADP libre.

El cálculo del ADP libre se basa en el equilibrio de la reacción de la creatina quinasa y de la adenilato quinasa (**Dudley et al, 1987**). La ecuación es la siguiente:

$$(\text{ADP libre}) = (\text{ATP}) \times (\text{Creatina}) / K_{\text{obs}} \times (\text{H}^+) \times (\text{CP})$$

Donde: $K_{\text{obs}} = 1,66 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$

Tabla 7.3.-ADP libre en músculo estimulado (A), descansado (B) y con estimulación final (C) ($\mu\text{mol/gTF}$ promedio \pm DE, n entre paréntesis).

| A | Control | 20'' | 1' | 5' | 15' | 30' |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ADP | 0,021 \pm 0,007 (9) | 0,036 \pm 0,007 (7) | 0,024 \pm 0,008 (6) | 0,009 \pm 0,004 (6) | 0,014 \pm 0,007 (7) | 0,009 \pm 0,004 (6) |

Valor de P respecto del grupo control ns

| B | Control | 1'30' | 5'30' | 15'30' | 30'30' | 30'3h |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| ADP | 0,021 \pm 0,007 (9) | 0,014 \pm 0,004 (7) | 0,010 \pm 0,005 (7) | 0,007 \pm 0,002 (7) | 0,049 \pm 0,049 (3) ** | 0,009 \pm 0,005 (7) |

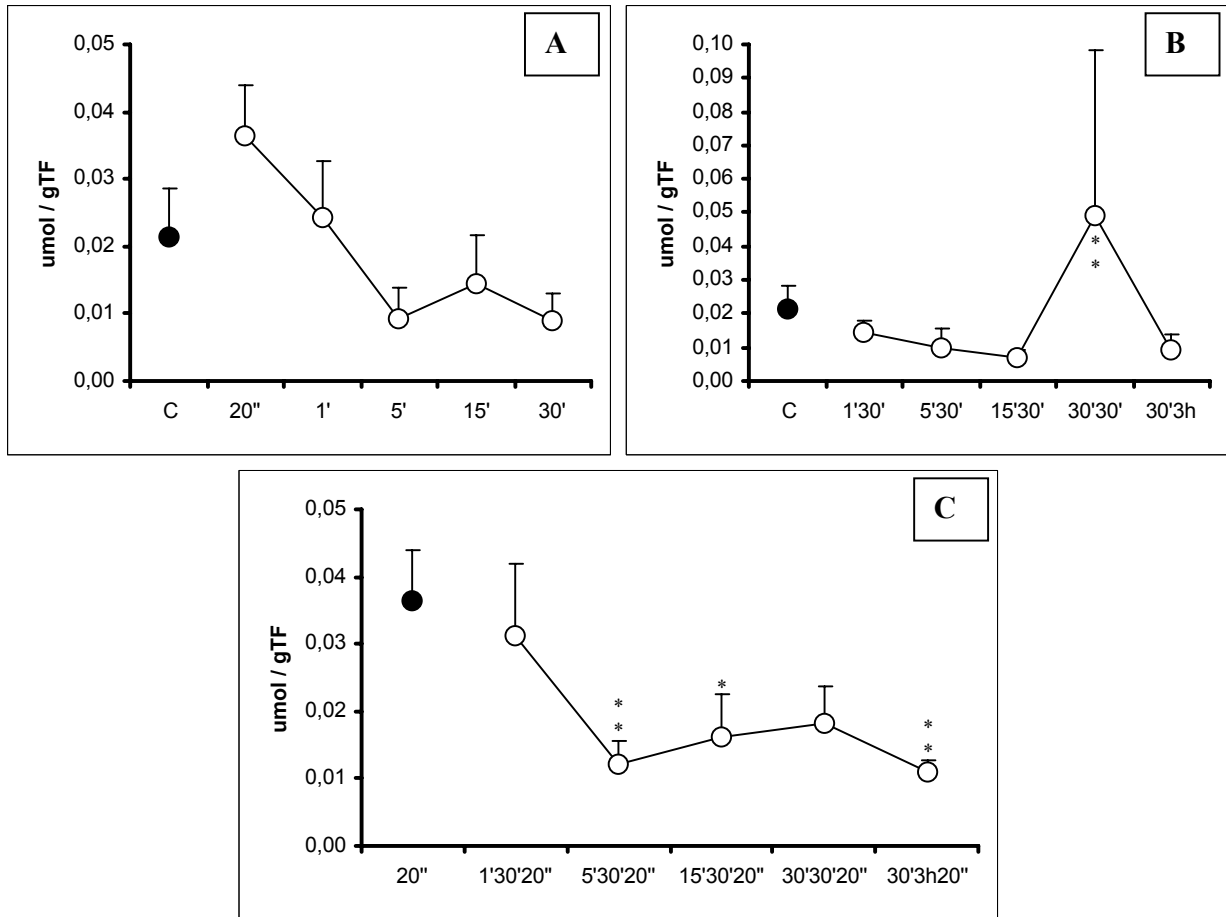
Valor de P respecto del grupo control ** P<0,01

| C | 20'' | 1'30'20'' | 5'30'20'' | 15'30'20'' | 30'30'20'' | 30'3h20'' |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| ADP | 0,036 \pm 0,007 (7) | 0,031 \pm 0,011 (7) | 0,012 \pm 0,003 (7) ** | 0,016 \pm 0,006 (7) * | 0,019 \pm 0,006 (3) | 0,011 \pm 0,002 (4) ** |

Valor de P respecto del grupo 20'' * P<0,05 ** P<0,01

Respecto del grupo control la estimulación no produjo modificación significativa. Respecto del grupo control con el descanso hubo aumento significativo en el grupo 30'30' en 133,3 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'3h20'' en 66,7 – 55,6 y 69,4 % (Figura 7.3).

Figura 7.3.-ADP libre en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio ± DE).



7.4.-Cálculo del AMP libre.

El cálculo del AMP libre se basa en el equilibrio de la reacción de la creatina quinasa y de la adenilato quinasa (**Dudley et al, 1987**).

La ecuación es la siguiente:

$$(AMP_{libre}) = (ADP_{libre})^2 / K_{obs} \times (ATP)$$

Donde: $K_{obs} = 1,05$

Tabla 7.4.- AMP libre en músculo estimulado (A), descansado (B) y con estimulación final (C) (nmol/gTF promedio \pm DE, n entre paréntesis).

| A | Control | 20'' | 1' | 5' | 15' | 30' |
|----------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| AMP | 0,070 \pm 0,047 (9) | 0,237 \pm 0,125 (7) ** | 0,177 \pm 0,103 (6) | 0,043 \pm 0,036 (6) | 0,072 \pm 0,064 (7) | 0,036 \pm 0,032 (6) |

Valor de P respecto del grupo control ** P<0,01

| B | Control | 1'30' | 5'30' | 15'30' | 30'30' | 30'3h |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| AMP | 0,070 \pm 0,047 (9) | 0,040 \pm 0,015 (7) | 0,031 \pm 0,025 (7) | 0,015 \pm 0,007 (7) | 0,114 \pm 0,049 (2) | 0,024 \pm 0,021 (7) |

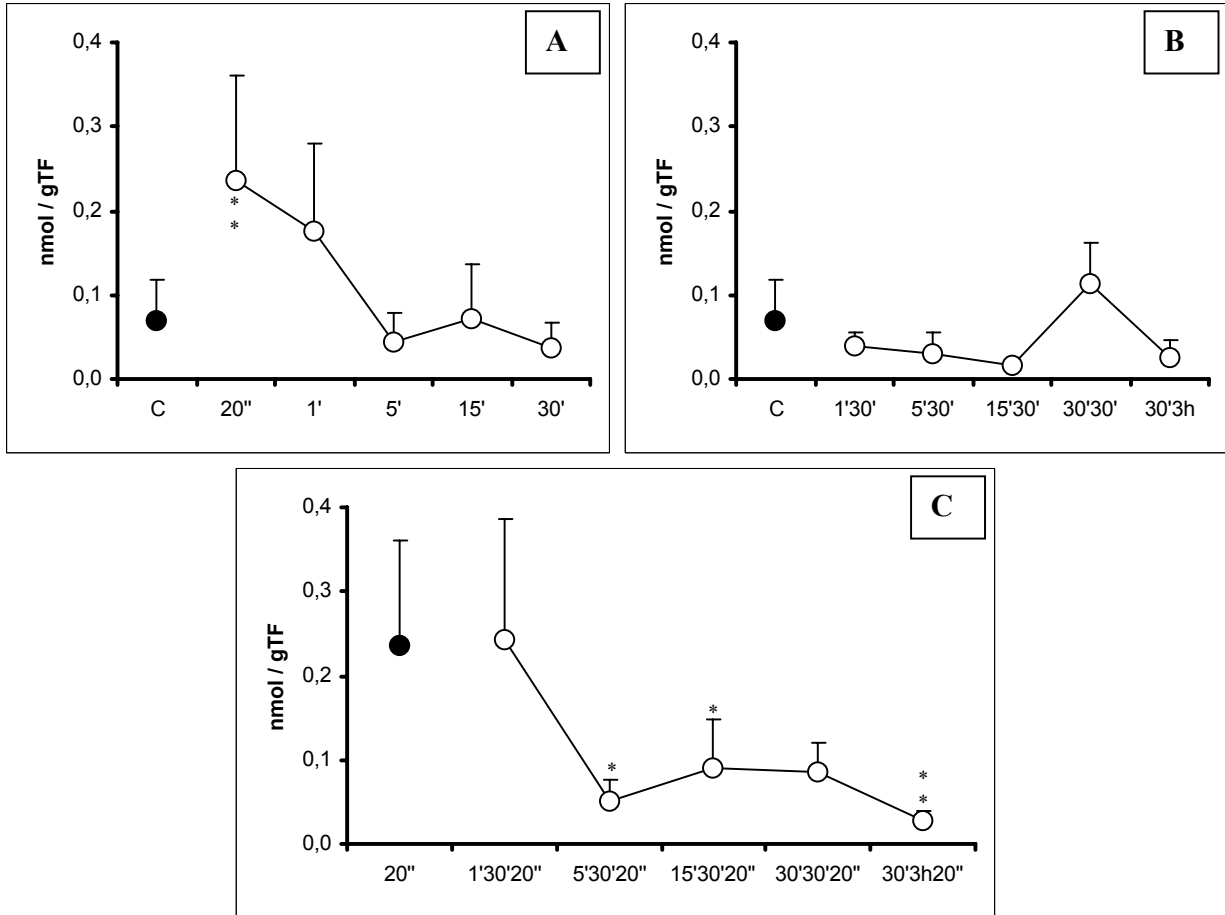
Valor de P respecto del grupo control ns

| C | 20'' | 1'30'20'' | 5'30'20'' | 15'30'20'' | 30'30'20'' | 30'3h20'' |
|----------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| AMP | 0,237 \pm 0,125 (7) | 0,242 \pm 0,144 (7) | 0,050 \pm 0,026 (7) * | 0,090 \pm 0,057 (7) * | 0,085 \pm 0,034 (3) | 0,028 \pm 0,010 (4) ** |

Valor de P respecto del grupo 20'' * P<0,05 ** P<0,01

Respecto del grupo control la estimulación produjo aumento significativo a los 20 s en 238,6 %. Respecto del grupo control el descanso no produjo modificación significativa. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'3h20'' en 78,9 – 62 y 88,2 % (Figura 7.4).

Figura 7.4.-AMP libre en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE).



7.5.-Nucleótidos totales.**Tabla 7.5.-Nucleótidos totales de músculo estimulado (A), descansado (B) y con estimulación final (C) ($\mu\text{mol/gTF}$ promedio \pm DE, n entre paréntesis).**

| A | Control | 20'' | 1' | 5' | 15' | 30' |
|----------|----------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 6,9 \pm 0,6 (9) | 5,8 \pm 0,8 (7) | 3,5 \pm 0,3 (6) *** | 2,1 \pm 0,5 (6) *** | 3,1 \pm 0,6 (7) *** | 2,4 \pm 0,5 (6) *** |

Valor de P respecto del grupo control *** P<0,001

| B | Control | 1'30' | 5'30' | 15'30' | 30'30' | 30'3h |
|----------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 6,9 \pm 0,6 (9) | 5,0 \pm 1,0 (7) *** | 3,4 \pm 0,8 (7) *** | 3,3 \pm 1,0 (7) *** | 3,9 \pm 0,1 (2) *** | 4,0 \pm 0,5 (7) *** |

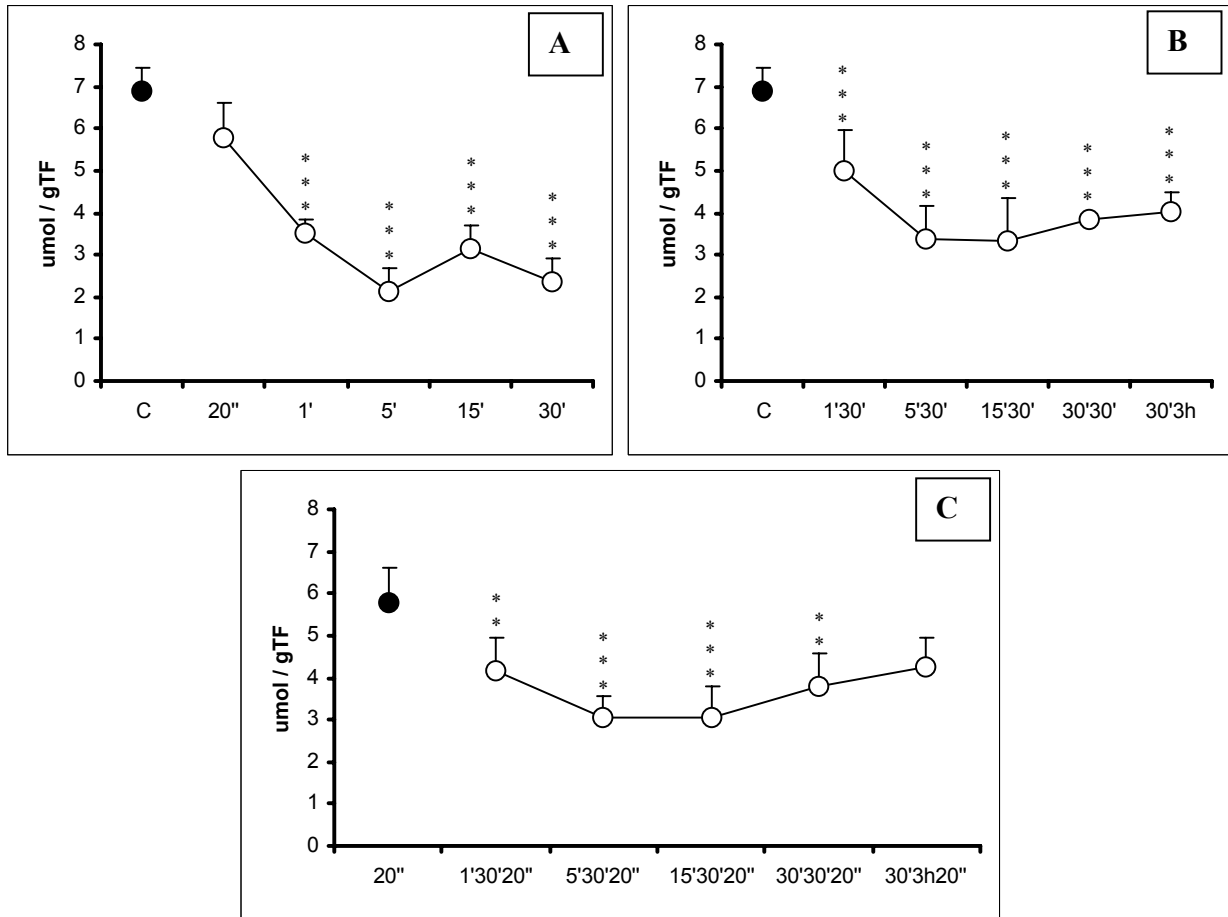
Valor de P respecto del grupo control *** P<0,001

| C | 20'' | 1'30'20'' | 5'30'20'' | 15'30'20'' | 30'30'20'' | 30'3h20'' |
|----------|----------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------|
| | 5,8 \pm 0,8 (7) | 4,2 \pm 0,8 (7) ** | 3,0 \pm 0,5 (7) *** | 3,1 \pm 0,7 (7) *** | 3,8 \pm 0,8 (3) ** | 4,3 \pm 0,7 (4) |

Valor de P respecto del grupo 20'' ** P<0,01 *** P<0,001

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminución significativa en los grupos 1 – 5 – 15 y 30 min en 49,3 – 69,6 – 55,1 y 65,2 %. Respecto del grupo control el descanso produjo disminución significativa en todos los grupos en 27,5 – 50,7 – 52,2 – 43,5 y 42 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 1'30'20'' – 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'30'20'' en 27,6 – 48,3 – 46,6 y 34,5 % (Figura 7.5).

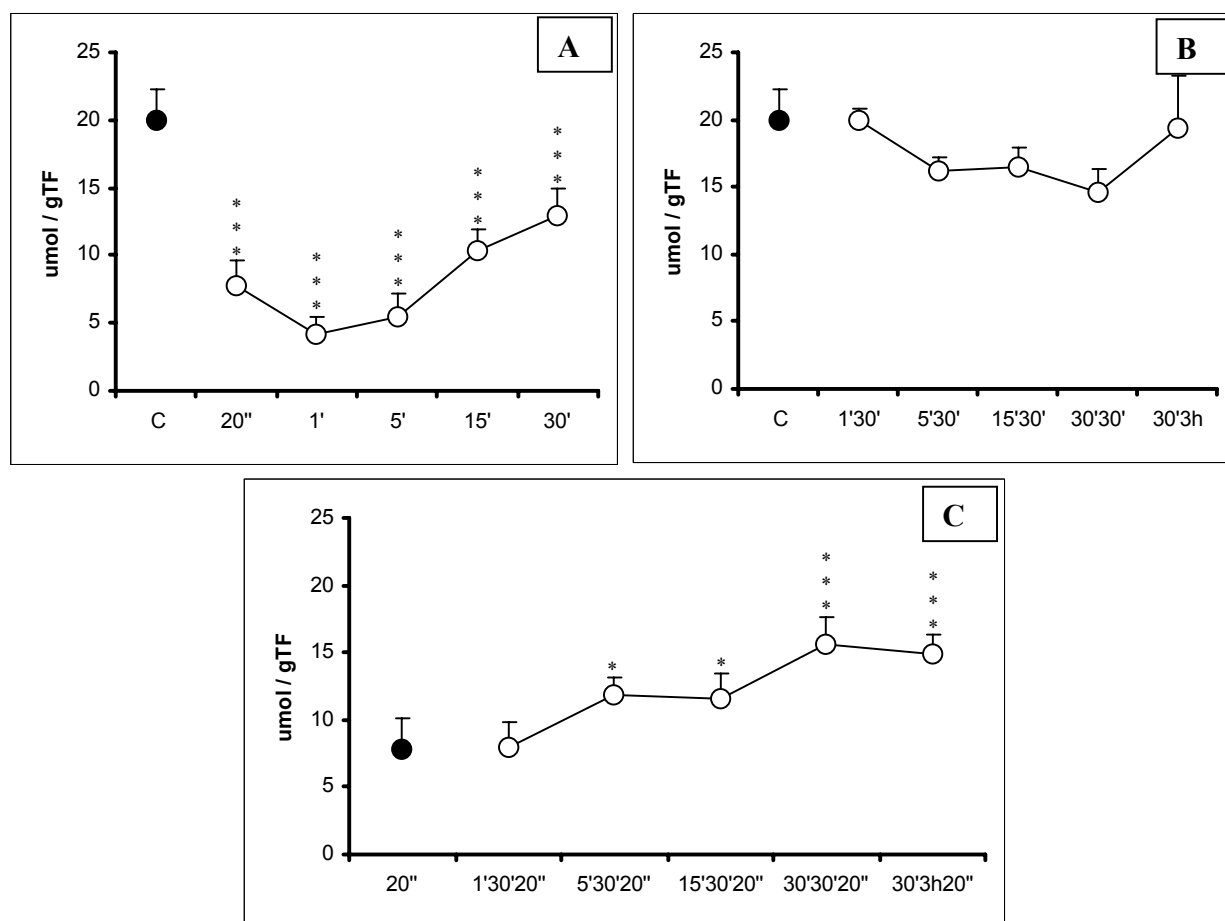
Figura 7.5.-Nucleótidos totales en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio ± DE).



7.6.-Fosfocreatina (PCr).

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminución significativa en todos los tiempos en 60,8 – 78,9 – 72,9 – 48,2 y 35,2 %. Comportamiento similar al observado por otros autores (**Green et al., 1992a; Cadefau et al., 1993**). Respecto del grupo control no hay diferencia significativa con el descanso. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo aumento significativo en los grupos 5'30'20'' – 15'30'20'' – 30'30'20'' y 30'3h20'' en 52,6 – 48,7 – 100 y 91,0 % (Figura 7.6).

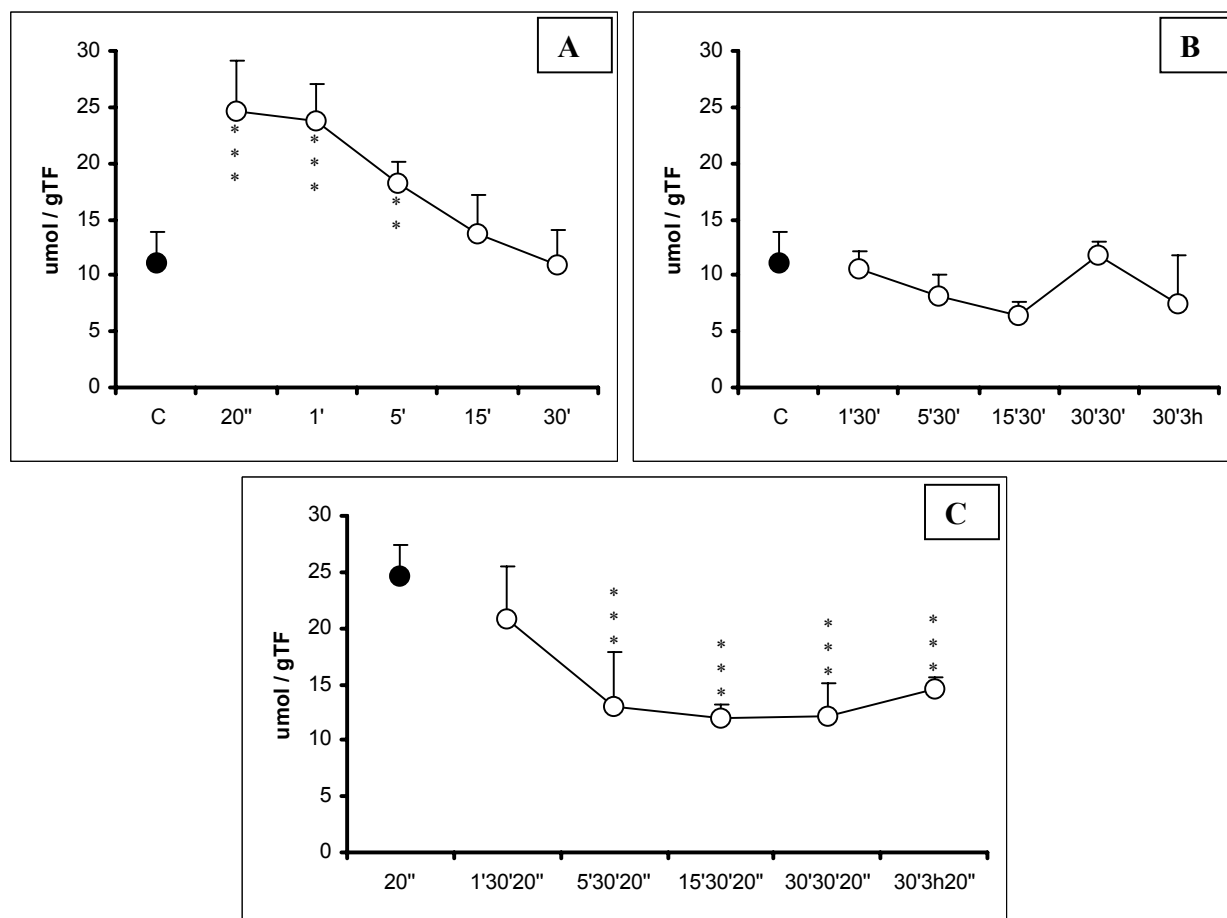
Figura 7.6.-PCr en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE).0



7.7.-Creatina.

Respecto del grupo control la estimulación produjo aumentos significativos a los 20 s, 1 min y 5 min en 120,7 – 113,5 y 64 %; a los 15 y 30 min los valores son similares al grupo control. Estos resultados son similares a los comunicados por otros autores (**Green et al., 1992a; Cadefau et al., 1993**). Respecto del grupo control no hay diferencia significativa con el descanso. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 5'30'20'' – 15'30'20'' – 30'30'20'' y 30'3h20'' en 46,5 – 51,0 – 50,2 y 40,4 % (Figura 7.7).

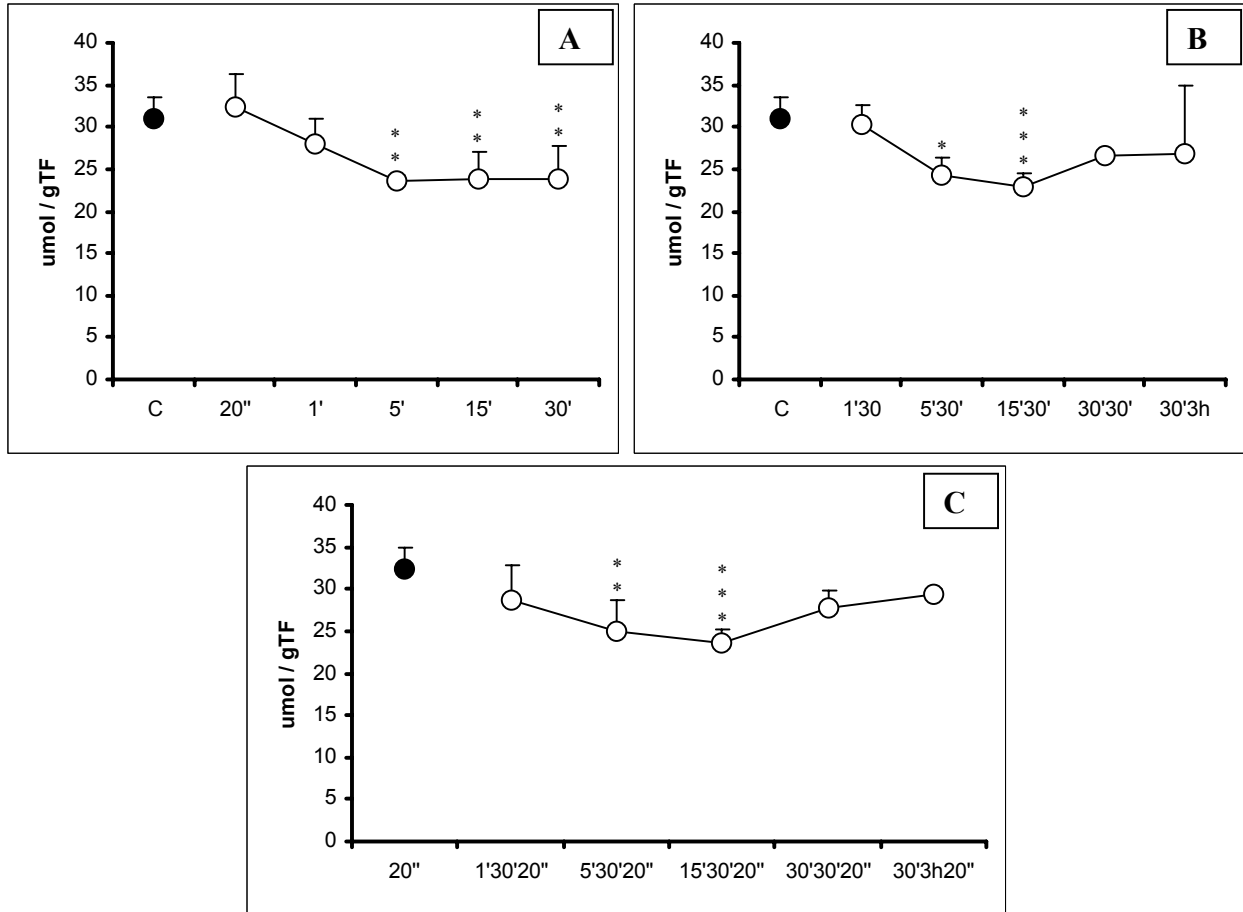
Figura 7.7.-Creatina en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE).



7.8.-Creatina total.

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminución significativa a los 5 – 15 y 30 min en 23,9 – 22,9 y 23,2 %. La disminución se podría deber a la disminución de PCr (Green et al., 1992a). Respecto del grupo control con el descanso disminuyó significativamente en los grupos 5'30' y 15'30' en 21,6 y 26,1 %, esto podría estar relacionada con la disminución de PCr. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 5'30'20'' y 15'30'20'' en 22,9 y 26,9 % (Figura 7.8).

Figura 7.8.-Creatina total en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio ± DE).



En Tablas 7.6 A, B y C se muestra los valores de metabolitos para todas las situaciones experimentales.

Tabla 7.6.-Metabolitos en músculo estimulado (A), descansado (B) y con estimulación final (C) (promedio \pm DE, n entre paréntesis).

| A | Control | 20'' | 1' | 5' | 15' | 30' |
|----------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| PG | 22,3 \pm 3,1 (9) | 15,3 \pm 3,2 (7) ** | 12,1 \pm 1,9 (6) *** | 6,3 \pm 1,0 (6) *** | 6,8 \pm 2,9 (7) *** | 5,1 \pm 2,2 (6) *** |
| MG | 21,3 \pm 4,9 (9) | 15,8 \pm 4,3 (7) | 15,4 \pm 2,4 (6) | 7,0 \pm 0,9 (6) *** | 6,4 \pm 0,9 (7) *** | 7,9 \pm 3,8 (6) *** |
| Glucógeno total | 43,6 \pm 7,6 (9) | 31,0 \pm 6,3 (7) * | 27,5 \pm 4,2 (6) *** | 13,3 \pm 1,7 (6) *** | 13,3 \pm 3,4 (7) *** | 12,9 \pm 5,8 (6) *** |
| Glucosa | 1,30 \pm 0,7 (9) | 0,49 \pm 0,16 (7) | 0,67 \pm 0,35 (6) | 1,89 \pm 0,74 (6) | 3,03 \pm 0,46 (7) *** | 3,41 \pm 1,07 (6) *** |
| Glc1P | 0,09 \pm 0,04 (9) | 0,21 \pm 0,07 (7) * | 0,33 \pm 0,20 (6) *** | 0,09 \pm 0,03 (6) | 0,07 \pm 0,02 (5) | 0,03 \pm 0,01 (6) |
| Glc6P | 1,1 \pm 0,5 (9) | 4,3 \pm 0,8 (7) *** | 5,0 \pm 2,0 (6) *** | 2,4 \pm 1,0 (6) | 0,3 \pm 0,1 (7) | 0,6 \pm 0,4 (6) |
| Fru6P | 0,20 \pm 0,08 (8) | 0,46 \pm 0,11 (7) *** | 0,52 \pm 0,15 (6) *** | 0,44 \pm 0,15 (6) *** | 0,08 \pm 0,04 (7) | 0,08 \pm 0,01 (6) |
| Fru1,6P ₂ | 0,37 \pm 0,21 (9) | 0,38 \pm 0,23 (7) | 0,10 \pm 0,04 (6) ** | 0,03 \pm 0,02 (6) *** | 0,04 \pm 0,03 (7) *** | 0,03 \pm 0,02 (6) *** |
| DHAP | 0,08 \pm 0,03 (9) | 0,08 \pm 0,03 (7) | 0,04 \pm 0,01 (6) ** | 0,02 \pm 0,004 (6) *** | 0,03 \pm 0,03 (7) *** | 0,03 \pm 0,03 (6) ** |
| Gli3P | 11,4 \pm 4,3 (9) | 13,5 \pm 7,4 (7) | 4,1 \pm 1,2 (6) ** | 4,8 \pm 1,6 (6) * | 4,9 \pm 3,8 (7) ** | 2,4 \pm 0,9 (6) *** |
| Piruvato | 0,16 \pm 0,04 (9) | 0,34 \pm 0,05 (7) ** | 0,31 \pm 0,06 (6) * | 0,17 \pm 0,09 (6) | 0,21 \pm 0,11 (7) | 0,18 \pm 0,08 (6) |
| Lactato | 4,4 \pm 1,0 (9) | 24,0 \pm 3,4 (7) *** | 34,3 \pm 6,2 (6) *** | 33,7 \pm 5,8 (6) *** | 14,4 \pm 1,2 (7) *** | 9,2 \pm 3,4 (6) |

Concentraciones en $\mu\text{mol/gTF}$, excepto Gli3P en nmol/gTF y glucógeno en $\mu\text{mol glucosa/gTF}$.
Valor de P respecto del grupo control * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

| B | Control | 1'30' | 5'30' | 15'30' | 30'30' | 30'3h |
|----------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| PG | 22,3 ± 3,1 (9) | 11,6 ± 3,8 (7) *** | 9,8 ± 2,6 (7) *** | 9,9 ± 5,4 (7) *** | 6,2 ± 2,5 (3) *** | 17,1 ± 4,6 (7) |
| MG | 21,3 ± 4,9 (9) | 13,2 ± 4,5 (7) ** | 12,8 ± 4,1 (7) ** | 11,3 ± 4,3 (7) *** | 9,7 ± 1,3 (3) *** | 18,6 ± 5,2 (7) |
| Glucógeno Total | 43,6 ± 7,6 (9) | 24,8 ± 8,1 (7) *** | 22,5 ± 6,5 (7) *** | 21,2 ± 9,4 (7) *** | 16,0 ± 3,4 (3) *** | 35,8 ± 9,6 (7) |
| Glucosa | 1,30 ± 0,7 (9) | 2,87 ± 0,74 (7) ** | 3,87 ± 1,27 (7) *** | 4,33 ± 0,86 (7) *** | 4,48 ± 0,89 (3) *** | 2,22 ± 0,42 (7) |
| Glc1P | 0,09 ± 0,04 (9) | 0,04 ± 0,02 (7) | 0,04 ± 0,01 (7) | 0,02 ± 0,01 (7) | 0,05 ± 0,04 (3) | 0,02 ± 0,01 (7) |
| Glc6P | 1,1 ± 0,5 (9) | 1,0 ± 0,4 (7) | 0,3 ± 0,1 (7) | 0,5 ± 0,2 (7) | 0,8 ± 0,1 (3) | 0,4 ± 0,2 (7) |
| Fru6P | 0,20 ± 0,08 (8) | 0,14 ± 0,07 (7) | 0,07 ± 0,02 (7) | 0,08 ± 0,03 (7) | 0,15 ± 0,02 (3) | 0,08 ± 0,03 (7) |
| Fru1,6P ₂ | 0,37 ± 0,21 (9) | 0,13 ± 0,07 (7) ** | 0,03 ± 0,02 (7) *** | 0,02 ± 0,01 (7) *** | 0,06 ± 0,01 (3) ** | 0,05 ± 0,02 (7) *** |
| DHAP | 0,08 ± 0,03 (9) | 0,05 ± 0,03 (7) | 0,03 ± 0,01 (7) *** | 0,03 ± 0,02 (7) *** | 0,007 ± 0,003 (3) *** | 0,02 ± 0,01 (7) *** |
| Gli3P | 11,4 ± 4,3 (9) | 7,3 ± 1,7 (7) | 4,1 ± 2,0 (7) ** | 5,5 ± 3,4 (7) * | 0,3 ± 0,5 (3) *** | 5,1 ± 2,2 (7) * |
| Piruvato | 0,16 ± 0,04 (9) | 0,15 ± 0,04 (7) | 0,28 ± 0,15 (7) | 0,19 ± 0,05 (7) | 0,09 ± 0,04 (3) | 0,12 ± 0,05 (7) |
| Lactato | 4,4 ± 1,0 (9) | 4,6 ± 0,9 (7) | 4,2 ± 1,3 (7) | 4,5 ± 1,0 (7) | 2,0 ± 0,5 (3) | 2,1 ± 0,8 (7) |

Concentraciones en $\mu\text{mol/gTF}$, excepto Gli3P en nmol/gTF y glucógeno en $\mu\text{mol glucosa/gTF}$.
 Valor de P respecto del grupo control * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

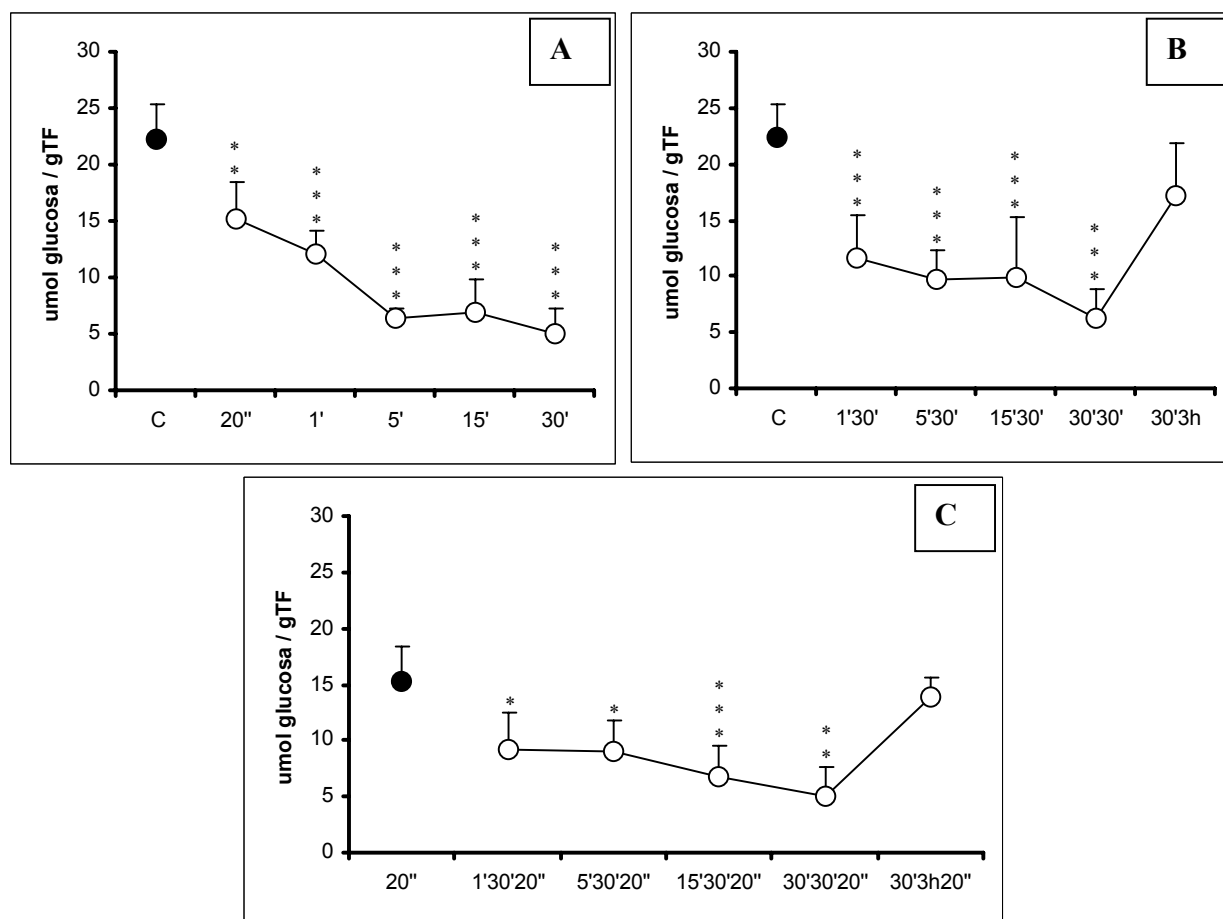
| C | 20'' | 1'30'20'' | 5'30'20'' | 15'30'20'' | 30'30'20'' | 30'3h20'' |
|----------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| PG | 15,3 ± 3,2 (7) | 9,3 ± 2,9 (7) * | 9,0 ± 2,7 (7) * | 6,8 ± 2,5 (7) *** | 5,1 ± 1,7 (3) ** | 13,9 ± 3,4 (4) |
| MG | 15,8 ± 4,3 (7) | 12,5 ± 2,9 (7) | 12,4 ± 3,2 (7) | 9,1 ± 1,9 (7) | 10,8 ± 3,8 (3) | 11,9 ± 1,2 (4) |
| Glucógeno total | 31,0 ± 6,3 (7) | 21,7 ± 5,4 (7) | 21,3 ± 5,6 (7) | 16,0 ± 4,2 (7) ** | 15,9 ± 5,1 (3) | 25,8 ± 4,1 (4) |
| Glucosa | 0,49 ± 0,16 (7) | 1,92 ± 0,30 (7) * | 3,72 ± 0,50 (7) *** | 3,48 ± 1,0 (7) *** | 4,5 ± 0,6 (3) *** | 1,35 ± 0,26 (4) |
| Glc1P | 0,21 ± 0,07 (7) | 0,12 ± 0,06 (7) | 0,05 ± 0,01 (7) *** | 0,03 ± 0,02 (7) *** | 0,04 ± 0,02 (3) ** | 0,10 ± 0,01 (4) |
| Glc6P | 4,3 ± 0,8 (7) | 3,0 ± 1,1 (7) | 1,0 ± 0,6 (7) *** | 0,9 ± 0,6 (7) *** | 0,8 ± 0,3 (3) *** | 2,6 ± 1,7 (4) |
| Fru6P | 0,46 ± 0,11 (7) | 0,38 ± 0,11 (7) | 0,21 ± 0,04 (7) *** | 0,08 ± 0,03 (7) *** | 0,16 ± 0,06 (3) *** | 0,15 ± 0,01 (4) *** |
| Fru1,6P ₂ | 0,38 ± 0,23 (7) | 0,24 ± 0,20 (7) | 0,07 ± 0,05 (7) *** | 0,04 ± 0,03 (7) *** | 0,06 ± 0,06 (3) ** | 0,09 ± 0,06 (4) ** |
| DHAP | 0,08 ± 0,03 (7) | 0,05 ± 0,03 (7) | 0,03 ± 0,02 (7) ** | 0,02 ± 0,01 (7) *** | 0,02 ± 0,01 (3) ** | 0,03 ± 0,004 (4) ** |
| Gli3P | 13,5 ± 7,4 (7) | 7,2 ± 2,7 (7) * | 4,0 ± 2,0 (7) *** | 3,7 ± 2,5 (7) *** | 3,9 ± 1,9 (3) ** | 6,0 ± 1,4 (4) * |
| Piruvato | 0,34 ± 0,05 (7) | 0,33 ± 0,07 (7) | 0,38 ± 0,11 (7) | 0,15 ± 0,07 (7) ** | 0,13 ± 0,03 (3) * | 0,27 ± 0,13 (4) |
| Lactato | 24,0 ± 3,4 (7) | 16,8 ± 3,0 (7) ** | 12,2 ± 1,5 (7) *** | 6,6 ± 1,8 (7) *** | 3,8 ± 1,9 (3) *** | 18,0 ± 5,7 (4) |

Concentraciones en $\mu\text{mol/gTF}$, excepto Gli3P en nmol/gTF y glucógeno en $\mu\text{mol glucosa/gTF}$.
 Valor de P respecto del grupo 20'' * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001

7.9.-Proglucógeno (PG).

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminución significativa en todos los tiempos en 31,4 – 45,7 – 71,7 – 69,5 y 77,1 %. A diferencia del MG, el PG disminuye desde los 20 s, lo que indica que las fibras musculares utilizan primero el almacenamiento de PG. Respecto del grupo control con el descanso los valores se mantienen significativamente bajos en todos los grupos en 48 – 56,1 – 55,6 – 72,2 y 23,3 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 1'30'20'' – 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'30'20'' en 39,2 – 41,2 – 55,6 y 66,7 % (Figura 7.9).

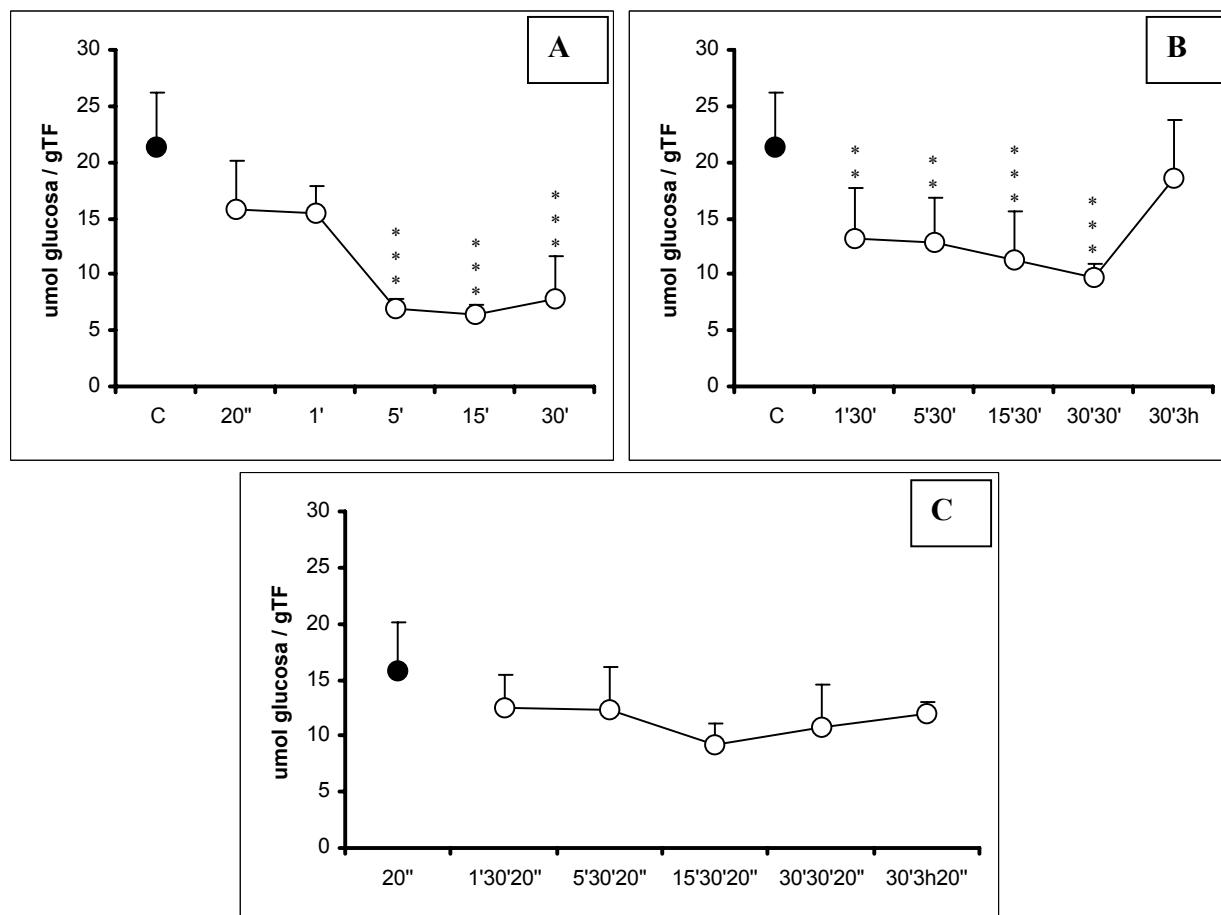
Figura 7.9.-PG en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE).



7.10.-Macroglucógeno (MG).

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminución significativa desde los 5 min en adelante en 67,1 – 70 y 62,9 % respectivamente. Respecto del grupo control con el descanso los valores se mantienen significativamente más bajos en los grupos 1'30' – 5'30' – 15'30' y 30'30' en 38 – 40 – 47 y 54,5 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final no produjo cambios significativos (Figura 7.10).

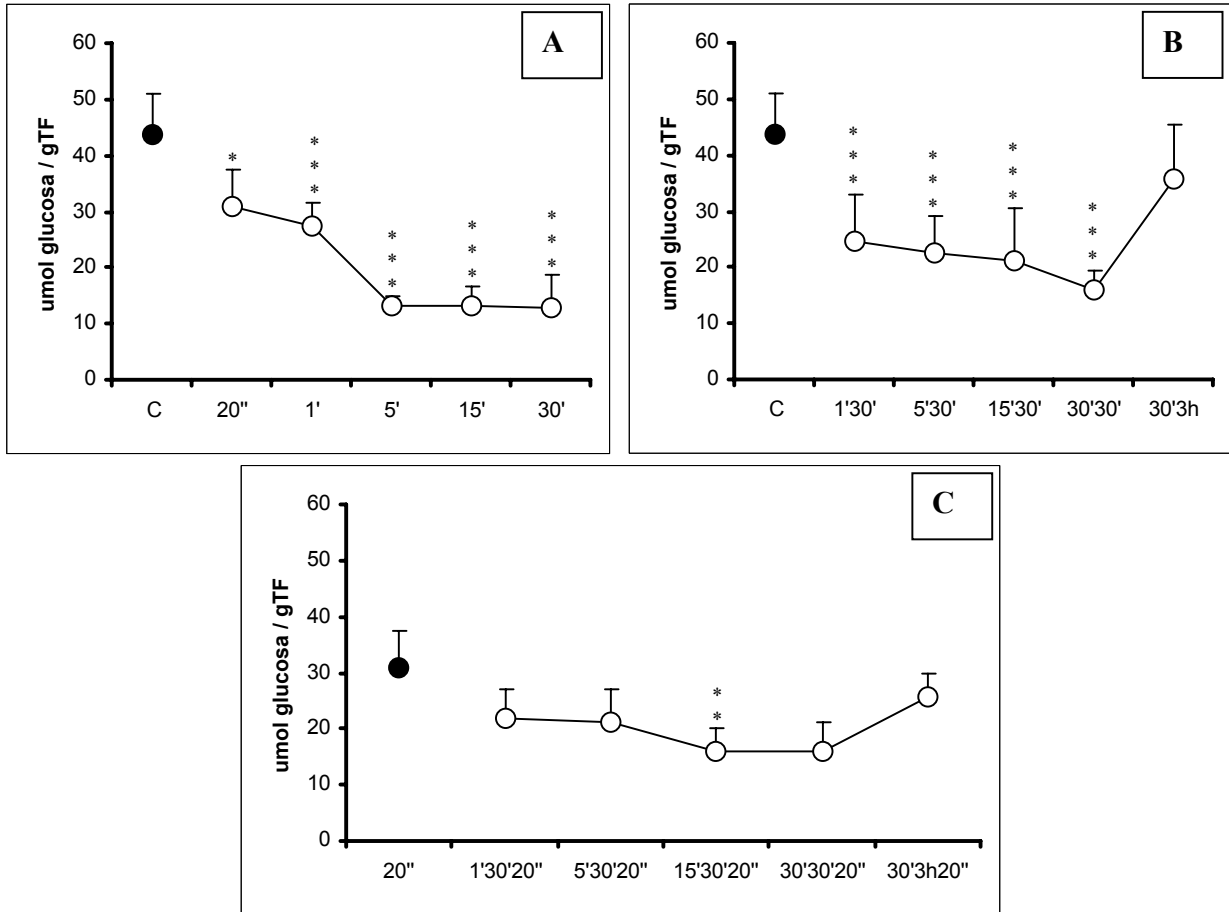
Figura 7.10.-MG en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE).



7.11.-Glucógeno total.

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminución significativa en todos los tiempos de estimulación, en 28,9 - 36,9 - 69,5 - 69,5 y 70,4 % respectivamente. Respecto del grupo control con el descanso los valores se mantuvieron significativamente más bajos en los grupos 1'30' - 5'30' - 15'30' y 30'30' en 43,1 - 48,4 - 51,4 y 63,3 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en el grupo 15'30'20'' en 48,4 % (Figura 7.11).

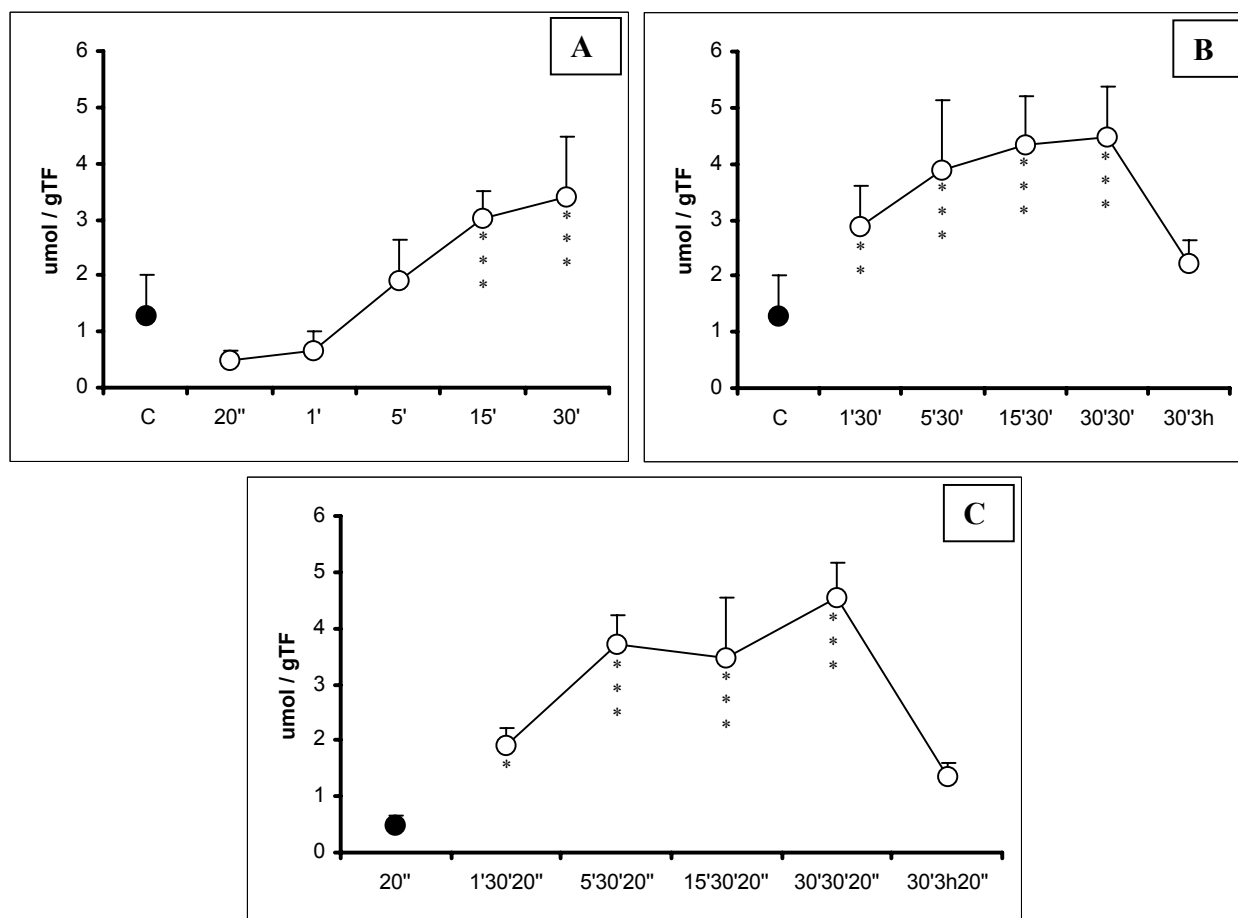
Figura 7.11.-Glucógeno total en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio ± DE).



7.12.-Glucosa.

Respecto del grupo control la estimulación produjo aumento significativo a los 15 y 30 min en 133,1 y 162,3 %. Este comportamiento es opuesto al mostrado por el glucógeno total, por lo menos desde los 5 min en adelante, a los 30 min el aumento es de 2,6 veces. Estos resultados son similares a los comunicados por otros autores (Green et al., 1992a; Cadefau, 1992; Cadefau et al., 1993). Con tiempos muy breves la concentración disminuye, si bien el cambio no es significativo. Respecto del grupo control con el descanso aumenta significativamente en los grupos 1'30' – 5'30' – 15'30' y 30'30' en 120,8 – 197,7 – 233,1 y 244,6 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo aumento significativo en los grupos 1'30'20'' – 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'30'20'' en 291,8 – 659,2 – 610,2 y 818,4 % (Figura 7.12).

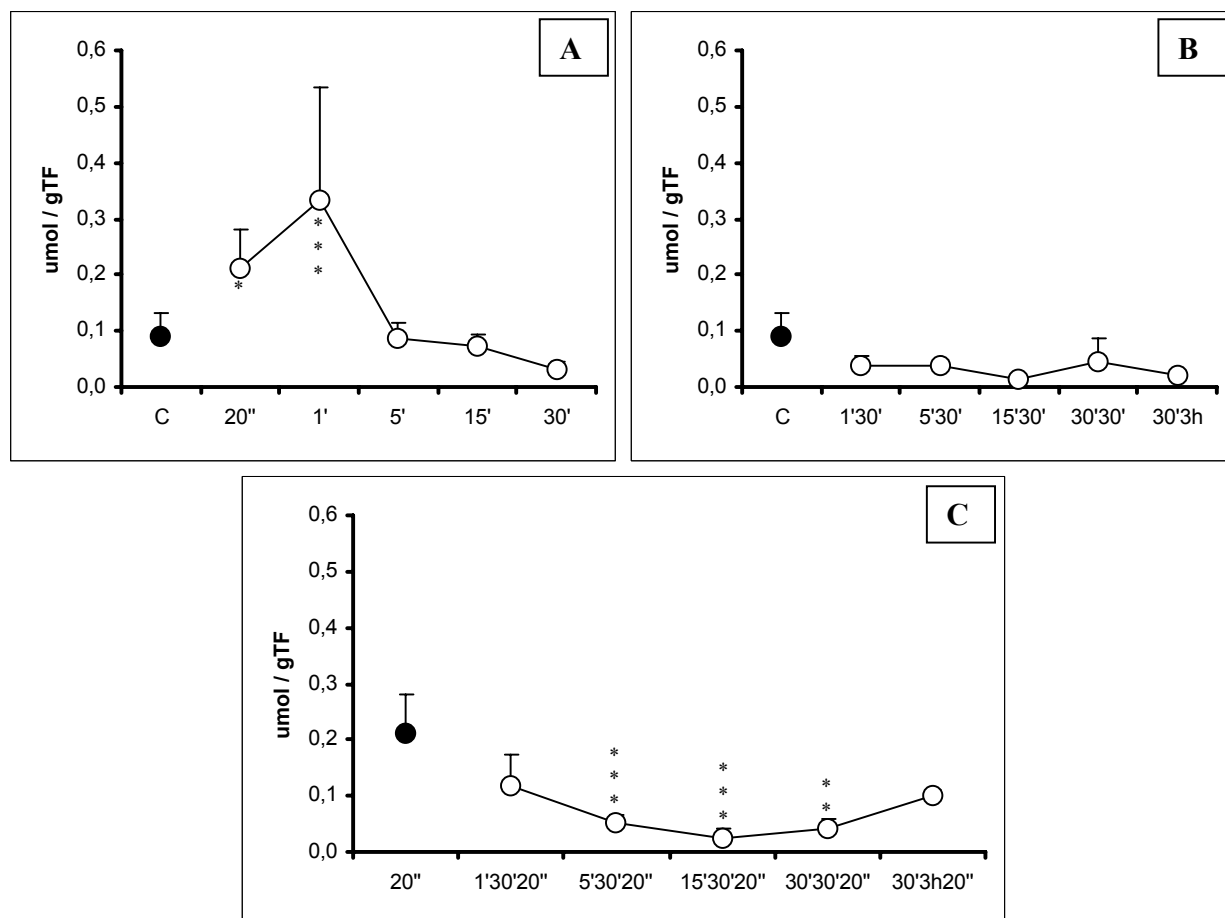
Figura 7.12.-Glucosa en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE).



7.13.-Glucosa-1-fosfato (Glc1P).

Respecto del grupo control la estimulación produjo aumento significativo a los 20 s y 1 min en 133,3 y 266,7 %. Estos valores son similares a los comunicados por otros autores (Cadefau, 1992; Cadefau et al., 1993). El comportamiento de Glc1P es opuesto al del glucógeno lo que se debe a que Glc1P es el nexo entre glucógeno y Glc6P. Respecto del grupo control con el descanso no hubo modificaciones significativas. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'30'20'' en 76,2 – 85,7 y 81 % (Figura 7.13).

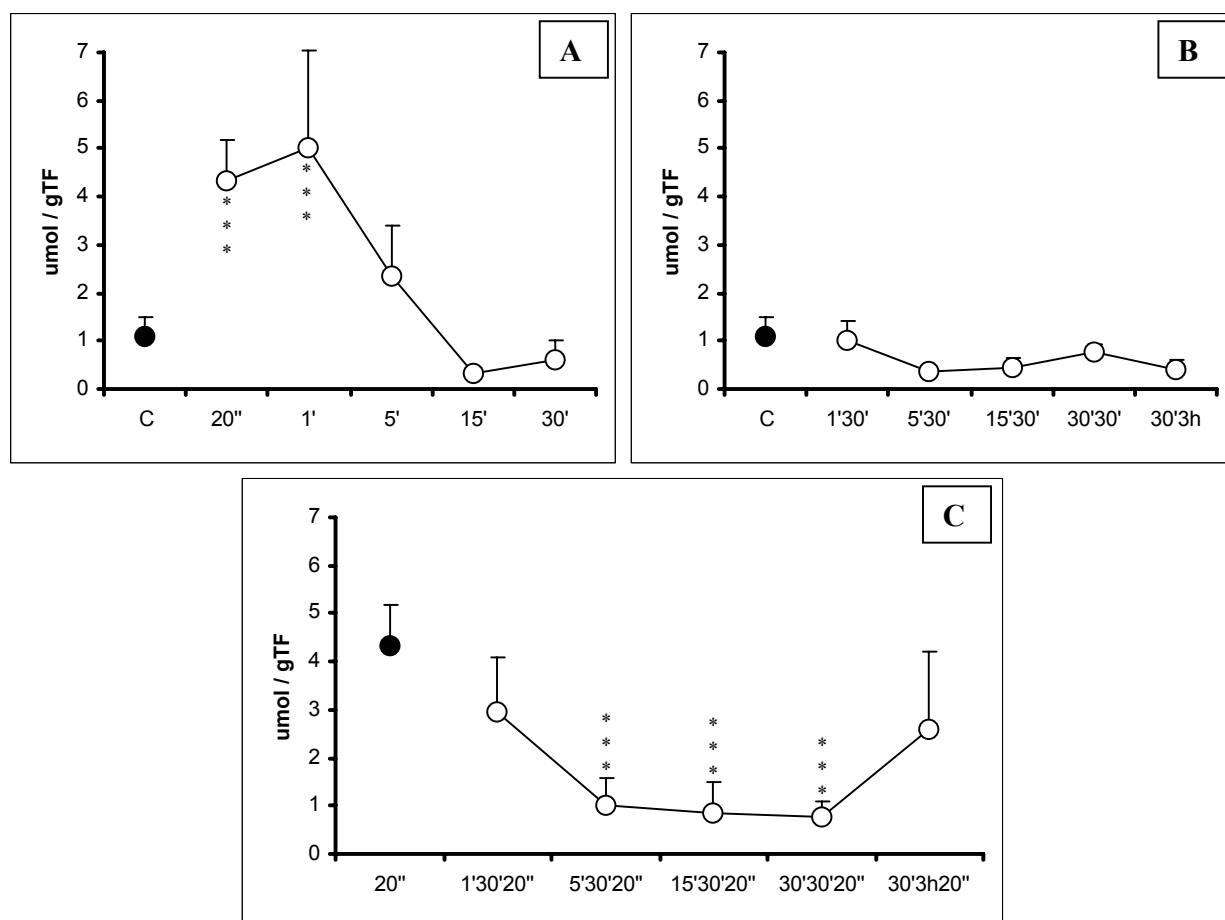
Figura 7.13.-Glc1P en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE).



7.14.-Glucosa-6-fosfato (Glc6P).

Respecto del grupo control la estimulación produjo aumento significativo a los 20 s y 1 min en 290,9 y 354,5 %. Estos resultados son similares a los comunicados por otros autores (Cadefau, 1992; Cadefau et al., 1993). Respecto del grupo control con el descanso no se modificó significativamente. Respecto del grupo 20 s la estimulación final de 20'' produjo disminución significativa en los grupos 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'30'20'' en 76,7 – 79,1 y 81,4 % (Figura 7.14).

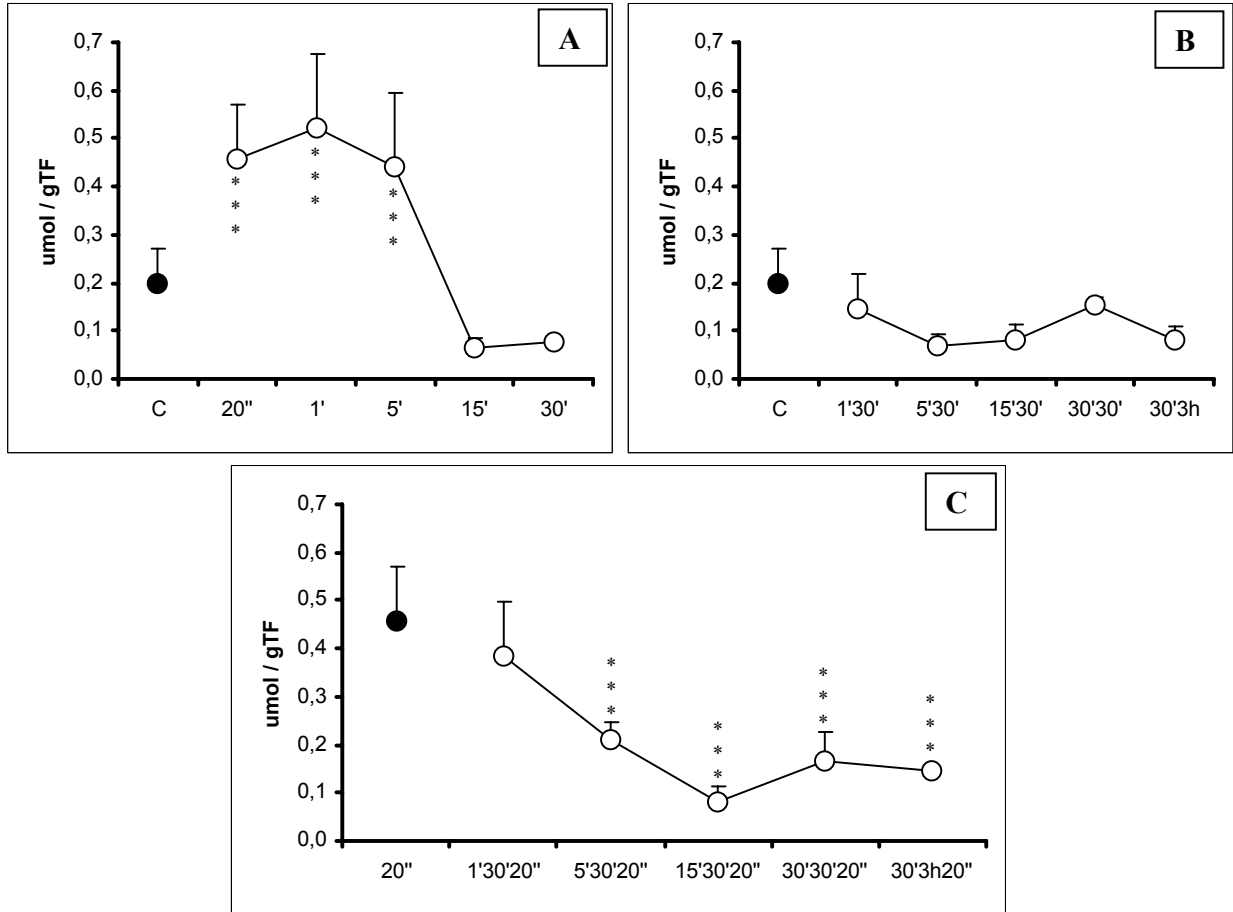
Figura 7.14.-Glc6P en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE).



7.15.-Fructosa-6-fosfato (Fru6P).

Respecto del grupo control la estimulación produjo aumento significativo a los 20 s – 1 y 5 min en 130 - 160 y 120 %. Estos resultados son similares a los comunicados por otros autores (Cadefau, 1992; Cadefau et al., 1993). Respecto del grupo control con el descanso no se modificó significativamente. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo aumento significativo en los grupos 5'30'20'' – 15'30'20'' – 30'30'20'' y 30'3h20'' en 81,6 – 89,5 – 84,2 y 76,3 % (Figura 7.15).

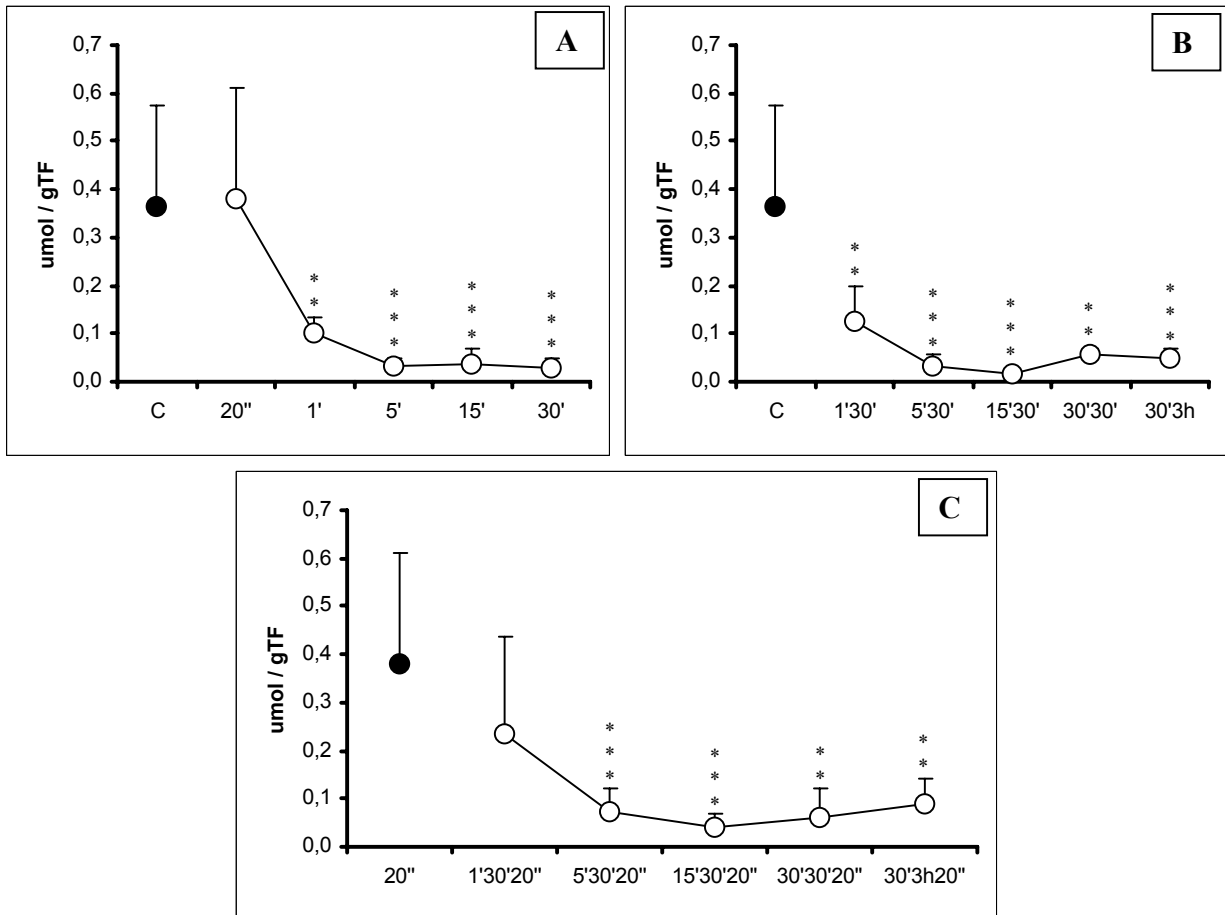
Figura 7.15.-Fru6P en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio ± DE).



7.16.-Fructosa-1,6-bisfosfato (Fru1,6P₂).

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminución significativa a 1 – 5 – 15 y 30 min en 73 – 91,9 – 89,2 y 91,9 %. Estos resultados son similares a los comunicados por otros autores (**Cadefau, 1992; Cadefau et al., 1993**). Los valores desde 1 a 30 min indican que Fru1,6P₂ se está transformando en DHAP y Gli3P. Respecto del grupo control con el descanso hubo disminución significativa en todos los grupos en 64,9 – 91,9 – 94,6 – 83,8 y 86,5 % respectivamente. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 5'30'20'' – 15'30'20'' – 30'30'20'' y 30'3h20'' en 81,6 – 89,5 – 84,2 y 76,3 % (Figura 7.16).

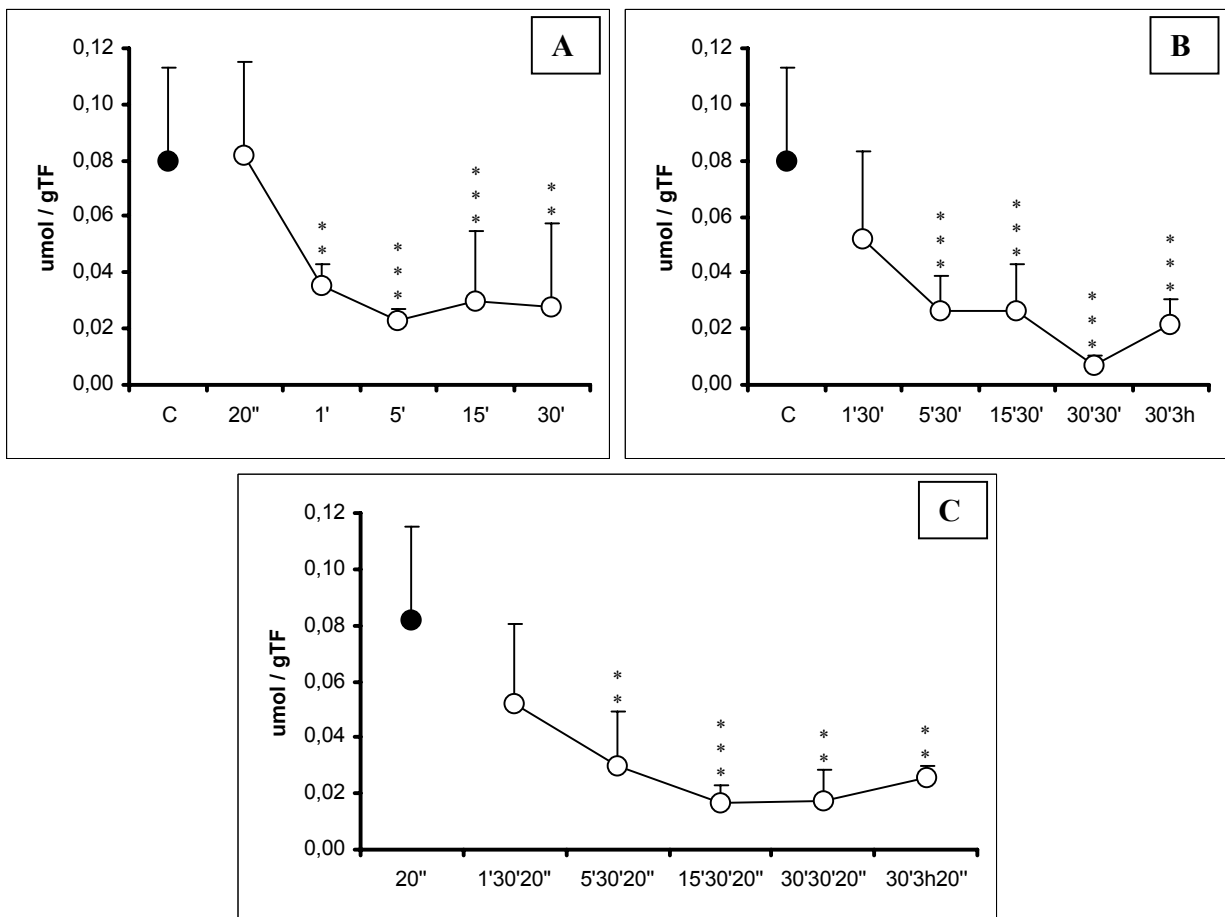
Figura 7.16.-Fru1,6P₂ en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio ± DE) (círculo negro es control).



7.17.-Dihidroxiacetonafosfato (DHAP).

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminuciones significativas en los grupos 1 – 5 – 15 y 30 min en 50 – 75 – 62,5 y 62,5 %. Estos resultados son similares a los comunicados por otros autores (Cadefau, 1992; Cadefau et al., 1993). El comportamiento de DHAP es similar al de F1,6P₂. Respecto del grupo control con el descanso los valores son significativamente más bajos en los grupos 5'30' – 15'30' – 30'30' y 30'3h en 62,5 – 62,5 – 91,3 y 75 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 5'30'20'' – 15'30'20'' – 30'30'20'' y 30'3h20'' en 62,5 – 75 – 75 y 62,5 % (Figura 7.17).

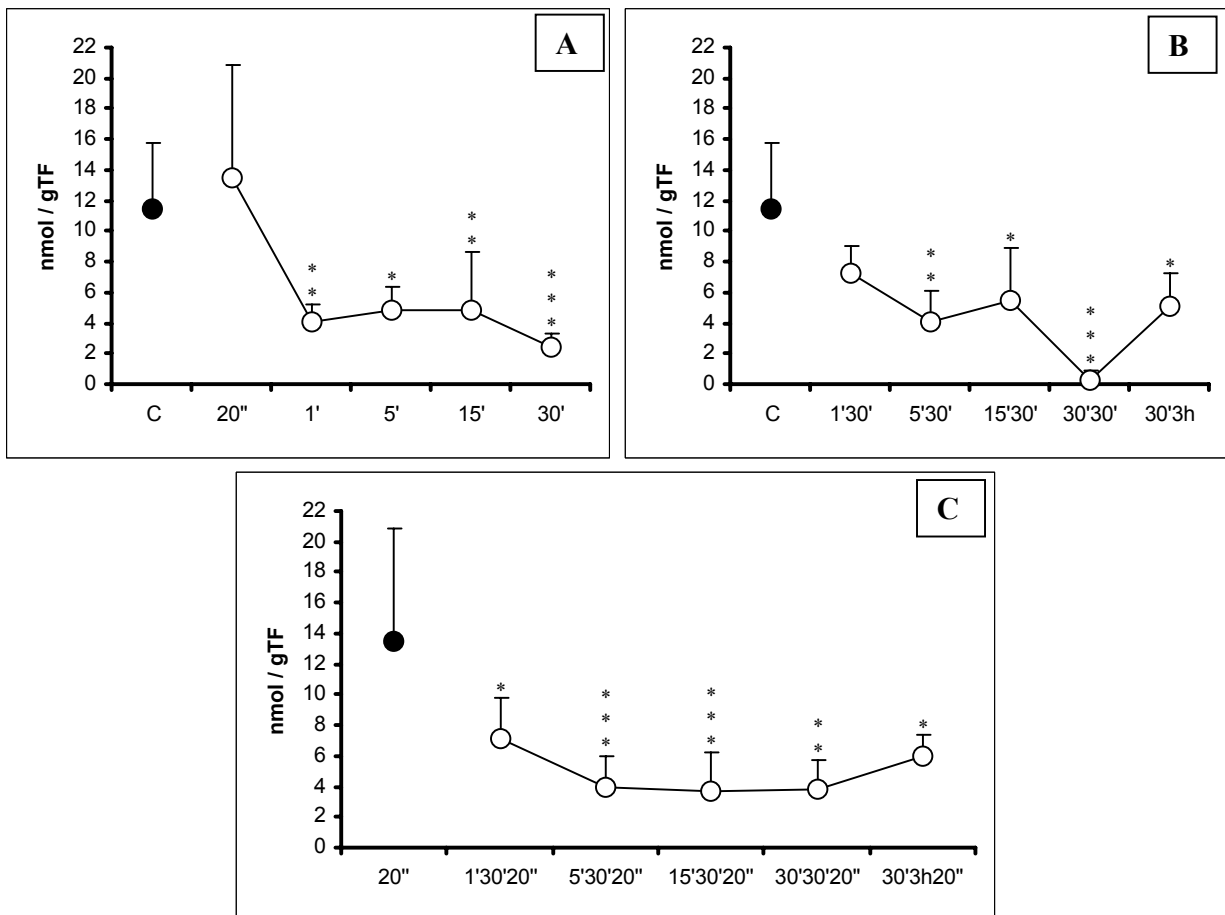
Figura 7.17.-DHAP en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio ± DE) (círculo negro es control).



7.18.-Gliceraldehído-3-fosfato (Gli3P).

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminución significativa en los grupos 1 – 5 – 15 y 30 min en 64 – 57,9 – 57 y 78,9 %. Estos resultados son similares a los comunicados por otros autores (Cadefau, 1992; Cadefau et al., 1993). El comportamiento de Gli3P es similar al de DHAP. Respecto del grupo control con el descanso hubo disminución significativa en los grupos 5'30' – 15'30' – 30'30' y 30'3h en 64 – 51,8 – 97,4 y 55,3 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en todos los grupos en 46,7 – 70,4 – 72,6 – 71,1 y 55,6 % (Figura 7.18).

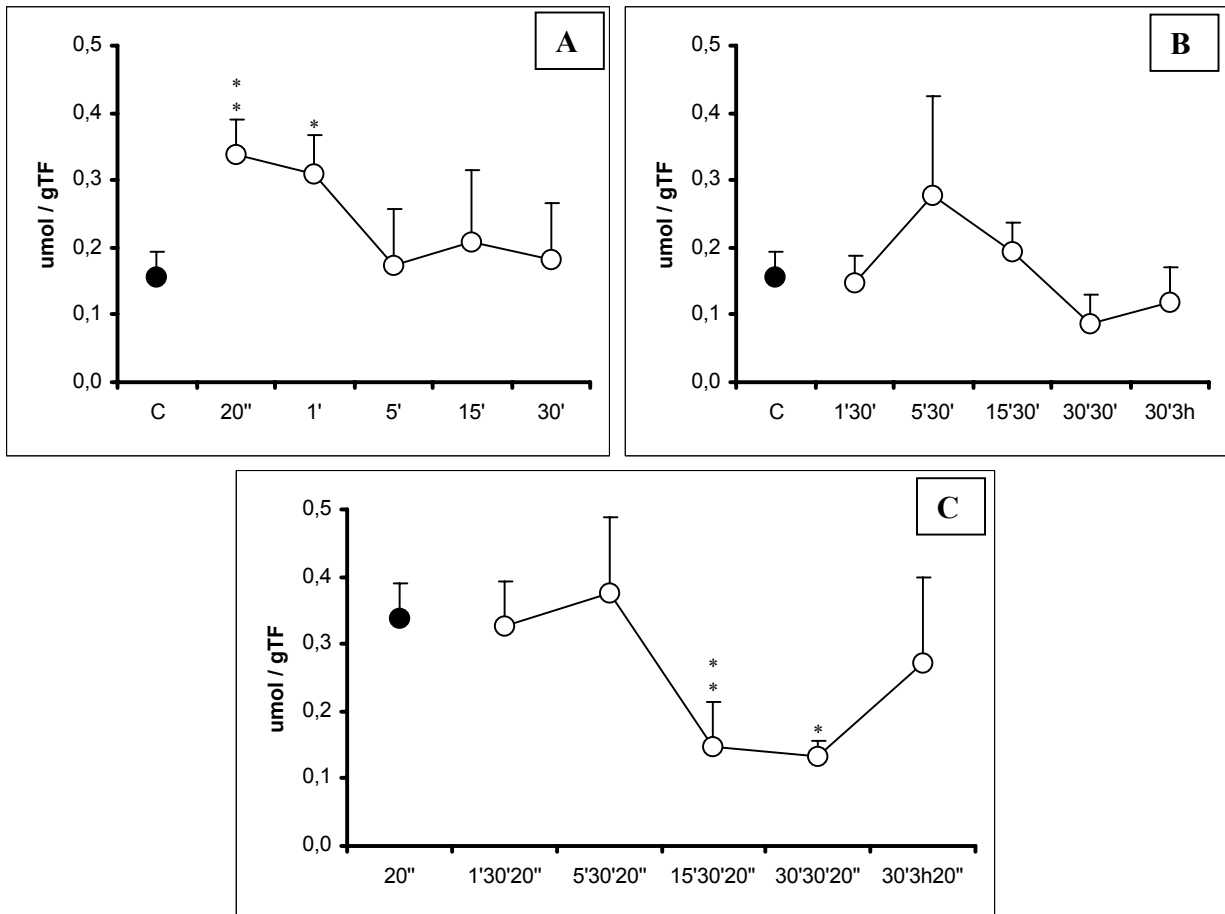
Figura 7.18.-Gli3P en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE) (círculo negro es control).



7.19.-Piruvato.

Respecto del grupo control la estimulación produjo aumentos significativos a los 20 s y 1 min en 112,5 y 93,8 %. Estos resultados son similares a los comunicados previamente (**Cadefau, 1992**). Piruvato aumenta y luego disminuye, lo que se relaciona con un comportamiento similar de lactato. Respecto del grupo control con el descanso no hubo cambios significativos. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 15'30'20'' y 30'30'20'' en 55,9 y 61,8 % (Figura 7.19).

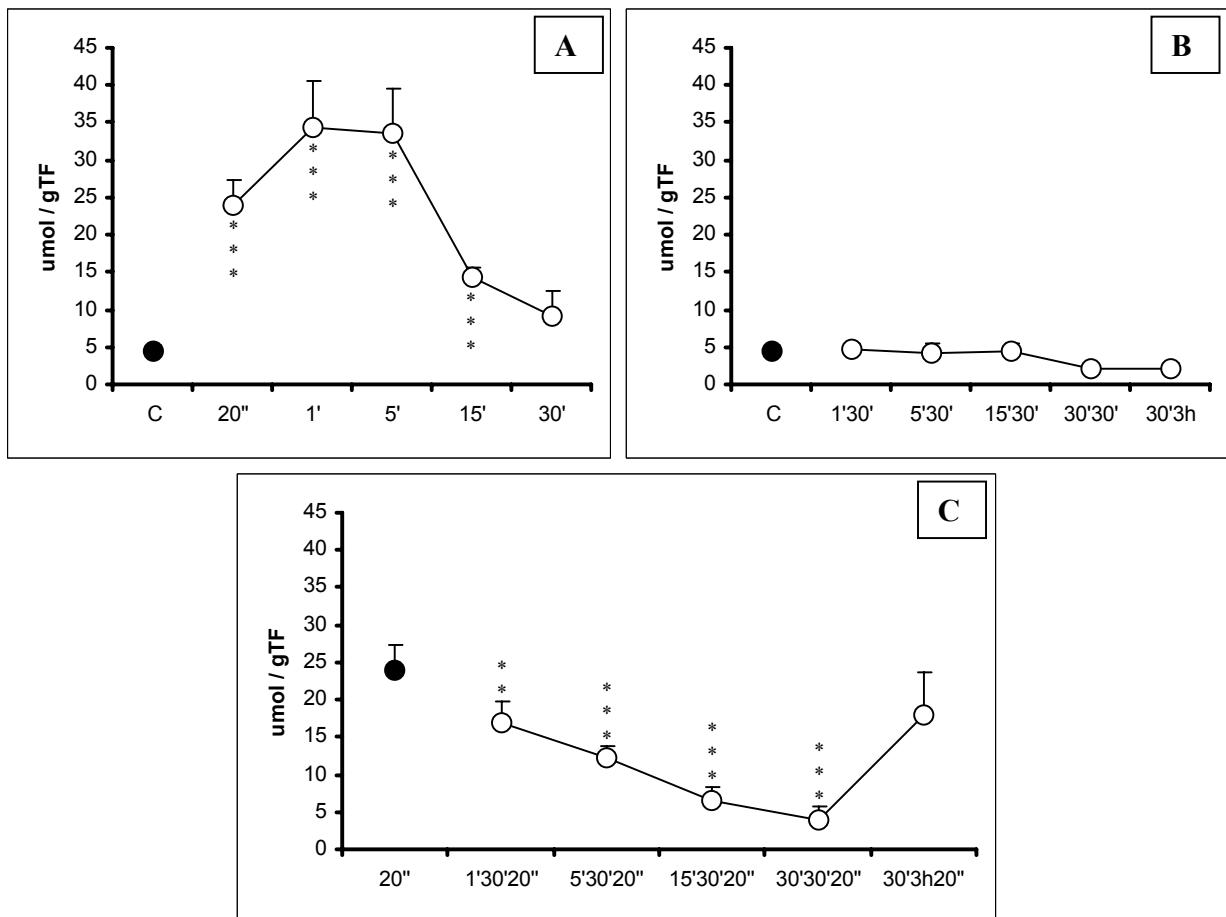
Figura 7.19.-Piruvato en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE) (círculo negro es control).



7.20.-Lactato.

Respecto del grupo control la estimulación produjo aumento significativo los 20 s - 1 - 5 y 15 min en 445,5 – 679,5 – 665,9 y 227,3 %. Estos resultados son similares a los comunicados por otros autores (Cadefau, 1992; Green et al., 1992a). A los 5 min aumenta casi 8 veces, luego decae y a los 30 min está aumentado 2 veces. El curso temporal del lactato es similar al del piruvato. Respecto del grupo control con el descanso no hubo diferencia significativa. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución significativa en los grupos 1'30'20'' – 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'30'20'' en 30 – 49,2 – 72,5 y 84,2 % (Figura 7.20).

Figura 7.20.-Lactato en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio ± DE) (círculo negro es control).



7.21.-Cálculo del pH.

El cálculo del pH se realizó utilizando una ecuación de regresión (Sahlin, 1978) para trabajo realizado con tejido fresco.

La ecuación es: $\text{pH} = 7,06 - 0,0226 \times (\text{Lactato} + \text{Piruvato})$

Tabla 7.7.-pH en músculo estimulado (A), descansado (B) y con estimulación final (C) (promedio \pm DE).

| A | Control | 20'' | 1' | 5' | 15' | 30' |
|----------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| pH | 6,96 \pm 0,02 (9) | 6,51 \pm 0,08 (7) *** | 6,28 \pm 0,14 (6) *** | 6,30 \pm 0,13 (6) *** | 6,73 \pm 0,03 (7) *** | 6,85 \pm 0,08 (6) |

Valor de P respecto del grupo control *** P<0,001

| B | Control | 1'30' | 5'30' | 15'30' | 30'30' | 30'3h |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| pH | 6,96 \pm 0,02 (9) | 6,95 \pm 0,02 (7) | 6,96 \pm 0,03 (7) | 6,95 \pm 0,02 (7) | 7,01 \pm 0,01 (3) | 7,01 \pm 0,02 (7) |

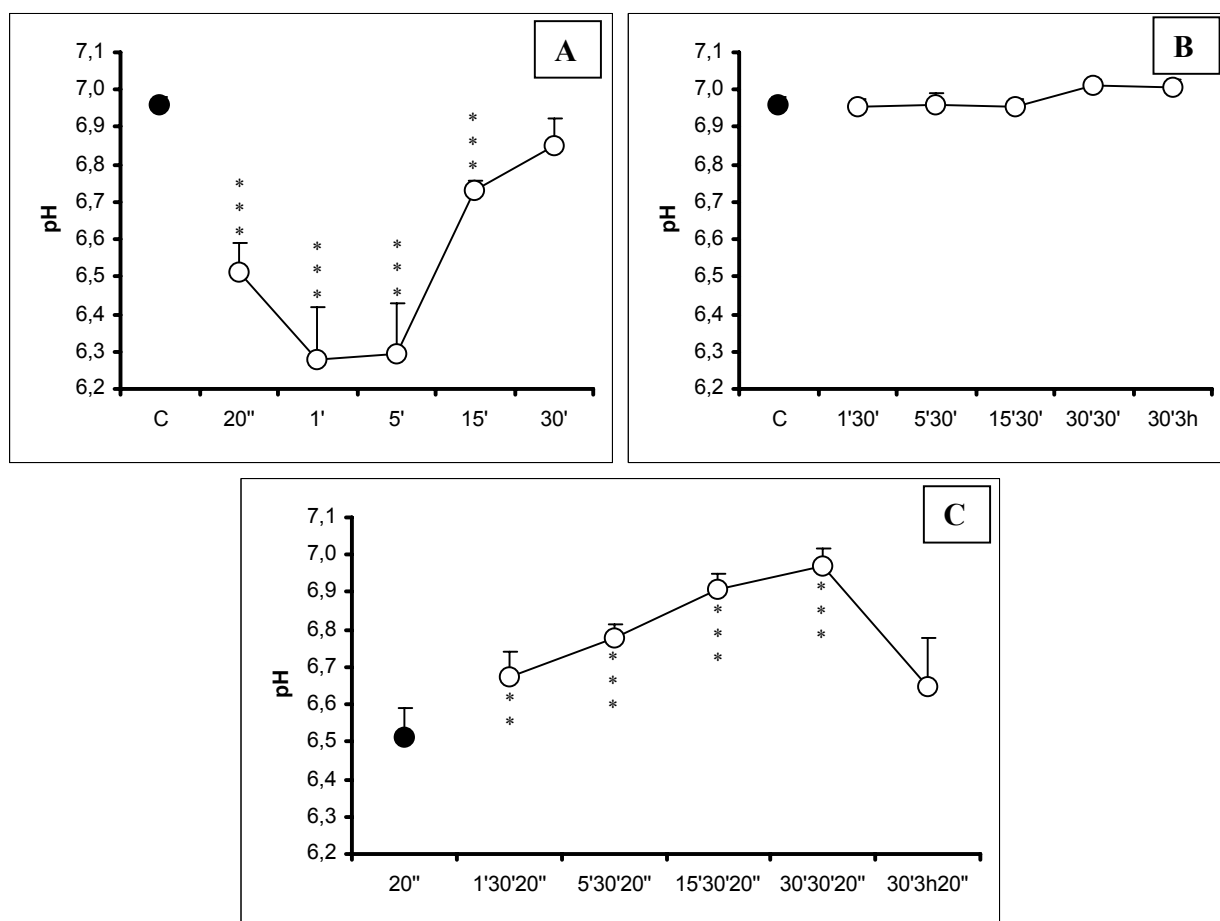
Valor de P respecto del grupo control ns

| C | 20'' | 1'30'20'' | 5'30'20'' | 15'30'20'' | 30'30'20'' | 30'3h20'' |
|----------|------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Ph | 6,51 \pm 0,08 (7) | 6,67 \pm 0,07 (7) ** | 6,78 \pm 0,04 (7) *** | 6,91 \pm 0,04 (7) *** | 6,97 \pm 0,04 (3) *** | 6,65 \pm 0,13 (4) |

Valor de P respecto del grupo 20'' ** P<0,01 *** P<0,001

Respecto del grupo control la estimulación produjo disminución significativa del pH, desde los 20 s a los 15 min en 6,5 – 9,8 – 9,5 y 3,3 %. Respecto del grupo control con el descanso no hubo modificación significativa. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo aumento significativo en los grupos 1'30'20'' – 5'30'20'' – 15'30'20'' y 30'30'20'' en 2,5 – 4,1 – 6,1 y 7,1 % (Figura 7.21).

Figura 7.21.-pH en función del tiempo de estimulación (A), descanso (B) y estimulación final (C) (promedio \pm DE) (círculo negro es control).



7.22.-Uso de la vía glucogenolítica.

El uso de la vía glucogenolítica se calculó a partir de la acumulación de metabolitos glucolíticos tal como fue descrito por Spriet y colaboradores (Spriet et al.,1987), quienes propusieron la siguiente ecuación:

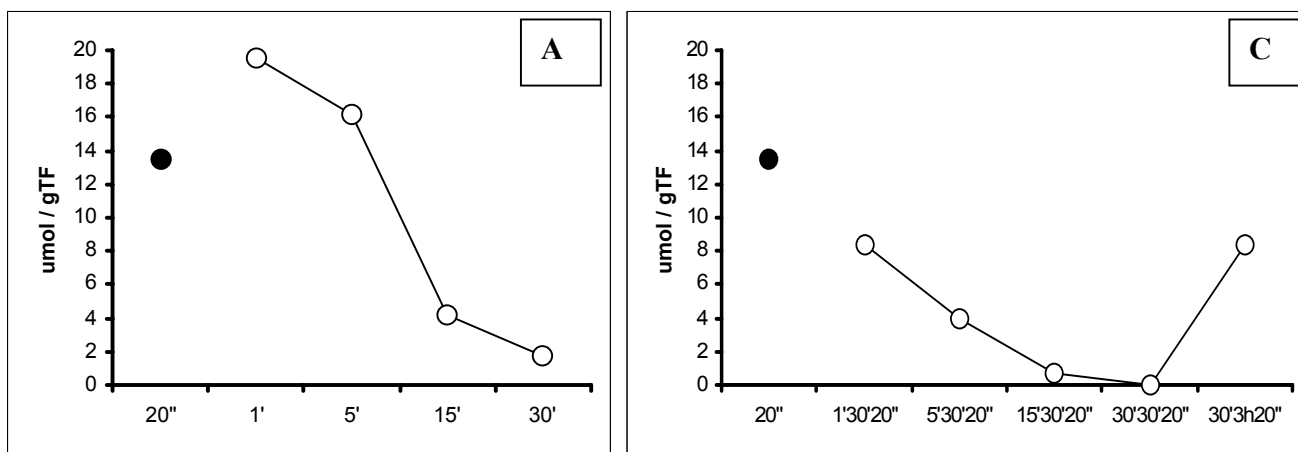
$$\text{Glucogenolisis} = (\text{G1Pf-G1Pi}) + (\text{G6Pf-G6Pi}) + (\text{F6Pf-F6Pi}) + 0,5 \times ((\text{Lacf-Laci}) + (\text{Pirf-Piri}))$$

En donde: f (final), i (inicial)

Tabla 7.8.-Valores uso de la vía glucogenolítica.

| 20'' | 1' | 1'30'20'' | 5' | 5'30'20'' | 15' | 15'30'20'' | 30' | 30'30'20'' | 30'3h20'' |
|-------|-------|-----------|-------|-----------|------|------------|------|------------|-----------|
| 13,50 | 19,53 | 8,37 | 16,16 | 3,91 | 4,15 | 0,66 | 1,76 | 0,00 | 8,32 |

Respecto del grupo 20'' la estimulación produjo aumento y luego; a 1 y 5 min aumentó en 44,7 y 19,7 %, a los 15 y 30 min disminuyó en 69,3 y 87 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución en todos los casos en 38 – 71 – 95,1 – 100 y 38,4 % (Figura 7.22).

Figura 7.22.-Uso de la vía glucogenolítica en función del tiempo de estimulación (A) y estimulación final de 20 s (B) (promedio) (círculo negro es control estiuado 20'').

7.23.-Uso de la vía glucolítica.

El uso de la vía glucolítica se calculó a partir de la acumulación de metabolitos glucolíticos tal como fue descrito por Spriet y colaboradores (**Spriet et al., 1987**), quienes propusieron la siguiente ecuación:

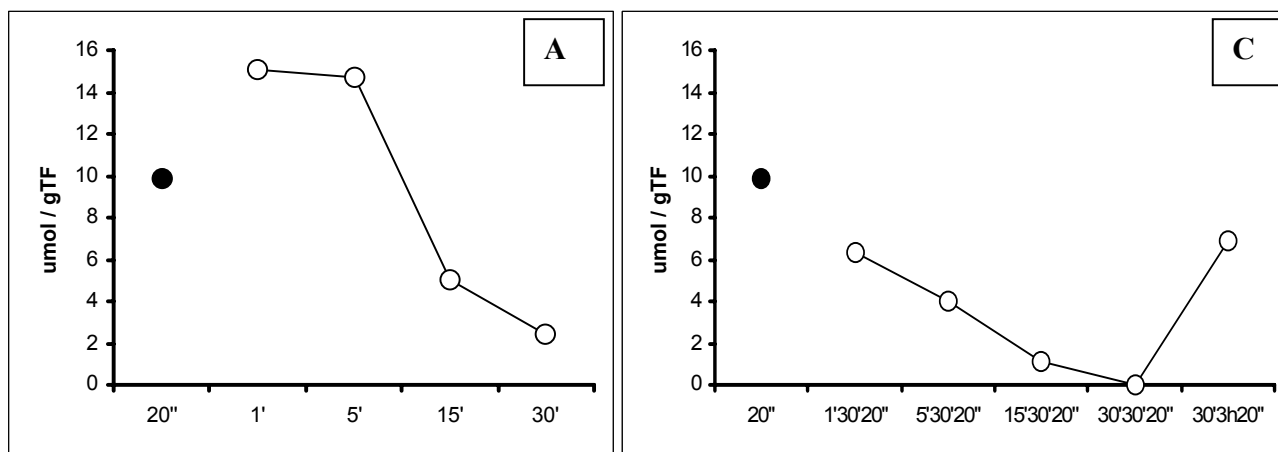
Glucólisis = $0,5 \times ((Lac_f - Lac_i) + (Pir_f - Pir_i))$. En donde: f (final), i (inicial)

Tabla 7.9.-Valores uso de la vía glucolítica.

| 20'' | 1' | 1'30'20'' | 5' | 5'30'20'' | 15' | 15'30'20'' | 30' | 30'30'20'' | 30'3h20'' |
|------|------|-----------|------|-----------|-----|------------|-----|------------|-----------|
| 9,9 | 15,0 | 6,3 | 14,7 | 4,0 | 5,1 | 1,1 | 2,4 | 0,0 | 6,9 |

Respecto del grupo 20'' la estimulación produjo aumento y luego disminución; a 1 y 5 min aumentó en 51,5 y 48,5 %, a los 15 y 30 min disminuyó en 48,5 y 75,8 %. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución en todos los casos en 36,4 – 59,6 – 88,9 – 100 y 30,3 % (Figura 7.23).

Figura 7.23.-Uso de la vía glucolítica en función del tiempo de estimulación (A) y estimulación final de 20 s (B) (promedio) (círculo negro es control estimulado 20'').



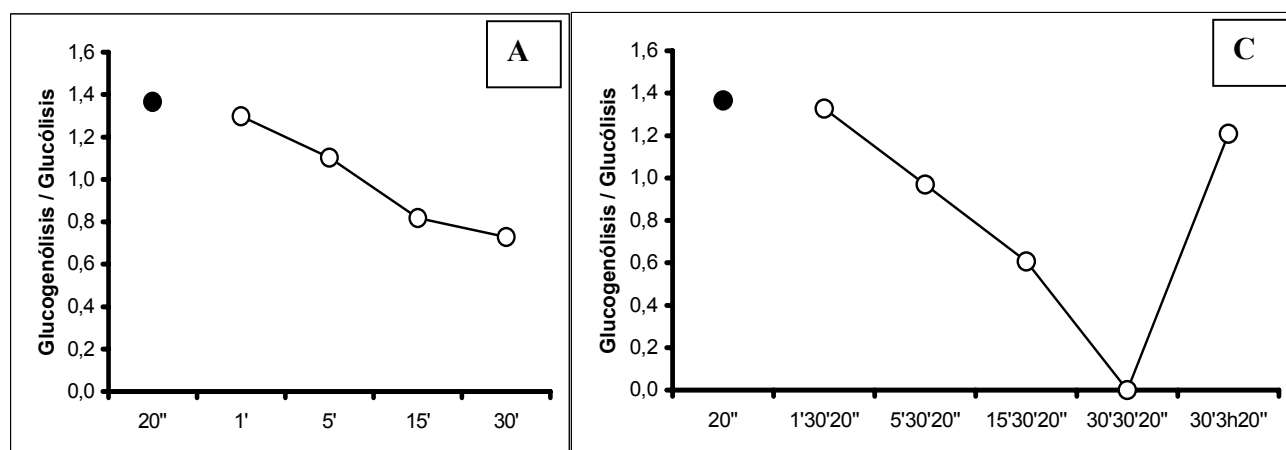
7.24.-Cuociente uso vía glucogenolítica / uso vía glucolítica.

Tabla 7.10.-Cuociente uso vía glucogenolítica / uso vía glucolítica.

| 20" | 1' | 1'30'20" | 5' | 5'30'20" | 15' | 15'30'20" | 30' | 30'30'20" | 30'3h20" |
|------|------|----------|-----|----------|------|-----------|------|-----------|----------|
| 1,36 | 1,30 | 1,33 | 1,1 | 0,98 | 0,81 | 0,60 | 0,73 | 0,0 | 1,21 |

Respecto del grupo 20'' la estimulación produjo disminución en 4,4 – 19,1 – 40,4 y 46,3 %. A los 20'' – 1 y 5 min domina la glucogenólisis, a los 15 y 30 min domina la glucólisis. Respecto del grupo 20'' la estimulación final produjo disminución en 2,3 – 27,9 – 55,9 – 100 y 11 %. En los grupos 1'30'20'' y 30'3h20'' domina la glucogenólisis y en los grupos 5'30'20'' y 15'30'20'' domina la glucólisis. (Figura 7.24).

Figura 7.24.-Cuociente uso vía glucogenolítica / uso vía glucolítica en función del tiempo de estimulación (A) y estimulación final de 20 s (círculo negro es control estimulado 20'').



CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar un estudio sobre fatiga muscular mediante el uso de EBF, con tiempos relativamente cortos. Para demostrar los efectos se eligió indicadores contráctiles, electrofisiológicos, peroxidación lipídica de membranas de RS, estructura de fracción microsomal y metabólicos. La hipótesis a probar fue que el músculo tibial anterior modificaría sus propiedades estructurales, funcionales y bioquímicas en las situaciones experimentales programadas para observar la aparición de fatiga muscular. El modelo experimental consideró realizar mediciones en grupos estimulados y contrastarlos con un grupo control no estimulado, en grupos a los cuales se les dió un descanso después de la estimulación y contrastarlos con un grupo control no estimulado y, en grupos a los cuales se les aplicó una estimulación final de 20'' y contrastarlos con un grupo con 20'' de estimulación. Con esta metodología se tendría un panorama sobre las capacidades desarrolladas por los músculos después de ser estimulados, darles un tiempo de descanso para observar su capacidad de recuperación y volver a ser estimulados con la finalidad de observar su capacidad de dar una nueva respuesta, en definitiva visualizar que tan fatigados se encontraban en alguna de las fases experimentales. Con la estimulación de baja frecuencia se trató, en definitiva, estudiar la aparición de fatiga muscular.

8.1.-Respuesta a la prueba de fatiga muscular.

El estudio demostró que en el grupo 15'30' el músculo TA tuvo el IF más pequeño y más significativo, sin embargo, el IF también es significativamente menor en el grupo 30'3h. Entonces la fatiga muscular se establece tempranamente y permanece por tiempo relativamente prolongado. Según registros de fatiga realizados por Burke y colaboradores en UM aisladas (Figura 1.6), a los 2 min de estimulación las fibras FF están totalmente fatigadas, en cambio las fibras FR aún desarrollan una buena tensión y las fibras tipo S no la modifican. Por lo tanto, en nuestros experimentos realizados con músculo TA sospechamos que en la medida que aumenta el tiempo de estimulación previa las fibras FF se fatigan tempranamente y no demuestran recuperación con el descanso, por tanto en los registros la tensión se debe más bien a las fibras S y FR. En los grupos en donde se realizó la prueba de fatiga la tensión inicial no es tan diferente respecto del grupo control sin preestimulación, sin embargo, la tensión final es significativamente menor sólo en el grupo 15'30' lo que se puede deber a que las fibras FF están fatigadas. En el grupo 30'3h el mayor tiempo de descanso no fue suficiente para que se recuperaran las fibras FF.

La pregunta siguiente fue por qué el grupo 15'30' dió un índice de fatiga tan pequeño. Una posible causa podría ser un deterioro del acoplamiento excitación-contracción. Al respecto los resultados mostraron una

disminución de la amplitud de la onda M. Es decir, el bajo IF del grupo 15'30' podría tener como fundamento una menor capacidad de generar potencial de acción fundamentalmente por las fibras tipo FF. Esta menor capacidad podría tener como causa un deterioro a nivel presináptico y/o postsináptico en la unión neuromuscular. En definitiva, la menor capacidad contráctil evidenciada por la prueba de fatiga más la menor amplitud de la onda M indica que el sitio de fallo se encontraría en un bloqueo de la propagación del potencial de acción (**Edwards et al., 1977a, b**). En los registros de fatiga se cumplió con que el estímulo fuera supramáximo para activar todas las fibras musculares, de manera que una menor tensión isométrica no puede ser atribuida a una insuficiente estimulación. La onda M o respuesta motora es el registro electrofisiológico del músculo evocado por la estimulación de su nervio motor. Representa la sumatoria de los potenciales de acción de cada una de las fibras musculares tipo I y II. Una menor amplitud del registro u onda M se interpreta en el sentido que una cantidad de fibras musculares quedan en silencio eléctrico. Para que cada fibra muscular exprese en plenitud su potencial de acción, previamente deben darse las condiciones de membrana para que ésta manifieste un potencial de reposo normal. Tanto el potencial de reposo como el potencial de acción dependen de varios factores, a saber: 1.-una estructura de la membrana celular normal, 2.-unas concentraciones normales de iones Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} , 3.-una bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ intacta, 4.-una bomba de Cl^- intacta, 5.-una bomba de Ca^{2+} intacta, 6.-una adecuada concentración de ATP para el adecuado funcionamiento de las bombas electrogénicas. La EBF provoca en la fibra muscular un aumento considerable de la utilización de ATP lo cual disminuye significativamente su concentración. Esto implica que las bombas electrogénicas, al no disponer de suficiente ATP, no logran restaurar las concentraciones extra e intracelular a la condición de reposo, con lo cual paulatinamente se deteriora el potencial de reposo y por ende el potencial de acción.

En trabajos previos (**Cadefau et al., 1993; Hicks et al., 1997**) en donde se usó 10 Hz como prueba de fatiga después de 24 h de preestimulación a 10 Hz, se sugiere que fibras musculares IIB no se contraen en músculos preestimulados. En nuestro caso, la preestimulación de 1, 5, 15 y 30 min a 10 Hz más el protocolo de Burke posiblemente exigió más aún a las fibras IIB porque se estimula a 40 Hz, dejándolas con una refractariedad similar o mayor. Para explicar la refractariedad se ha sugerido cambios en el medio iónico intracelular (**Cadefau et al., 1993**), una inactivación parcial reversible de la Ca^{2+} -ATPasa del RS (**Dux et al., 1990; Leberer et al., 1987; Matsushita & Pette, 1992; Matsushita et al., 1991**) y pérdida de K^+ por una actividad insuficiente de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa de sarcolema (**Green et al., 1992b**), lo que hace suponer que la actividad de este transportador es un factor limitante. Que fibras musculares IIB entren en refractariedad no se puede probar con el enfoque del presente trabajo, se debe realizar estudios en células aisladas en donde se relacionen parámetros electrofisiológicos, metabólicos y contráctiles para identificar cómo la menor tensión desarrollada se reparte entre las fibras musculares.

8.2.-Respuesta del RS a la estimulación a 10 Hz.

No se pueden descartar que en el proceso de fatiga muscular de nuestro modelo estén involucrados otros mecanismos celulares ligados a la capacidad contráctil del músculo.

Por ello se separó elementos de la fracción microsomal del RS en gradiente de sacarosa. Sin embargo, con los tiempos de estimulación utilizados no se produjo modificaciones en el bandeo de las distintas fracciones, lo que permite aseverar que con los tiempos de estimulación utilizados no hay deterioro del RS.

Modificaciones de la ultraestructura del RS ya han sido comunicadas anteriormente, éstas se logran con horas, días y semanas de estimulación (**Eisenberg et al., 1984; Eisenberg & Salmons, 1981**), en nuestro caso el máximo tiempo de estimulación fueron 30 min. Se ha comunicado alteraciones en la ultraestructura del RS como consecuencia de ejercicios únicos de alta intensidad o de 2 a 3 horas, con daños focalizados en el músculo (**Nimmo & Snow, 1982**). Nuestro trabajo demuestra que no hubo modificaciones transitorias ni daño del RS. Recientemente se ha comunicado que 24 h de estimulación a 10 Hz del músculo TA de conejo provoca un aumento notable en la fracción R4 que contiene RS pesado, tríadas y cisternas terminales (**Frías et al., 2005**), nosotros estuvimos muy por debajo de este tiempo.

Otra cuestión se relaciona con el uso de 10 Hz como preestimulación. El uso de esta frecuencia se basa en el funcionamiento normal de motoneuronas alfa pequeñas que inervan a células tipo I (**Fishbach & Robbins, 1969; Gustafsson, 1974; Fleshman et al., 1981**), en cambio las células musculares de tipo IIA y IIB descargan ráfagas de mayor frecuencia. La imposición de 10 Hz al músculo TA de conejo, que tiene una composición de 5% de I, 45% de IIA y 50% de IIB, (**Leberer & Pette, 1984; Leberer & Pette, 1986; Aigner et al., 1993; Hämäläinen & Pette, 1993**) afecta, justamente, a todas las fibras. Pues bien, en ejercicio físico donde el reclutamiento de UM se realiza de acuerdo a la intensidad progresiva del ejercicio hasta llegar a fatiga, se ha observado que las fibras musculares en donde se afecta más la captación de Ca^{2+} por el RS es en las tipo I, mientras que las tipo II mantienen tasas normales (**Byrd et al., 1989a; Fitts et al., 1982; Byrd, 1992**). La depresión en la captación de Ca^{2+} por el RS es progresiva con el aumento de la duración del ejercicio de baja intensidad (**Byrd et al., 1989a**), pero también se ha demostrado en ejercicios de alta intensidad y corta duración (**Byrd et al., 1989b**). La evidencia demuestra que la depresión en la captación de Ca^{2+} ocurre en paralelo con las deformidades ultraestructurales observadas en el RS (**Byrd et al., 1989b**).

En nuestro caso, la EBF debió afectar más al pequeño porcentaje de fibras musculares lentas y poco o nada a las fibras musculares rápidas, si fue así, entonces el alto porcentaje de fibras musculares rápidas debió mantener un manejo aceptable de la captación del Ca^{2+} con lo que el músculo debería de haber expresado un IF mejor que el observado, especialmente, en el grupo 15'30'. Sin embargo, el IF fue muy pequeño, lo cual hace sospechar que la causa de la fatiga pudo estar a nivel del potencial de acción muscular o de otro mecanismo.

En RS se estudió también la producción de MDA como índice de peroxidación lipídica. Los resultados no mostraron modificación significativa de MDA en el grupo 15'30' que fue el que obtuvo el IF más bajo. Un

aumento significativo se obtuvo en el grupo 30', pero con 30 min de descanso retornó a valor control. De manera que como resultado de la estimulación a 10 Hz sospechamos que no se produjo daño oxidativo significativo en el grupo 15'30', por lo que no podemos atribuir el bajo IF a un manejo alterado del Ca^{2+} por el RS debido a la actuación de los radicales libres.

8.3.-Respuesta metabólica del músculo a la estimulación a 10 pps.

El ATP almacenado libera la energía necesaria para sostener la contracción muscular por breve tiempo y la velocidad de hidrólisis es proporcional a la fuerza muscular (**Dawson et al., 1978**), de manera que utilización y producción deben equilibrarse para mantener la concentración en niveles óptimos; para ello las células usan PCr, glucogenólisis y glucólisis para resintetizar ATP.

La estimulación produjo disminución de ATP, la menor disponibilidad puede ser causa de fatiga muscular y el descanso revierte parcialmente la situación, de manera que con la prueba final de 20 s las fibras musculares no cuentan con una cantidad adecuada de ATP. La regeneración de ATP en base a PCr es superada por el uso del ATP. Con 15 y 30 min de estimulación la PCr aumenta paulatinamente, lo que hace sospechar la participación de otra fuente de síntesis de ATP.

En el músculo esquelético el proglucógeno representa aproximadamente entre el 75 % y el 80 % y el macroglucógeno entre el 20 y el 25 % (**Alonzo et al., 1995**). En nuestro trabajo las proporciones fueron prácticamente iguales, lo que es similar a lo encontrado por otros autores (**Prats, C. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, Unidad de Bioquímica, 2003**).

Durante la estimulación el glucógeno disminuye drásticamente hasta los 5 min, pero luego se estabiliza a unos niveles de aproximadamente el 30,2 % respecto del grupo control. El vaciamiento del almacenamiento del glucógeno se recupera parcialmente con el descanso, con 3 h de descanso llega al 82,1 % respecto del control. El uso intenso del glucógeno evidencia que la contracción del tibial anterior se realizó fundamentalmente en base al metabolismo glucolítico por la alta proporción de fibras rápidas. Para sostener el metabolismo glucolítico, proglucógeno y macroglucógeno se utilizan prácticamente en la misma proporción, sin embargo, las fibras musculares utilizan primero el almacenamiento de proglucógeno.

La disminución del glucógeno se acompaña inicialmente por una disminución no significativa de la glucosa, indicando que con estimulación breve las fibras musculares hacen uso de su glucosa, pero desde los 15 min su concentración aumenta drásticamente (2,6 veces más a los 30 min). El aumento de glucosa se puede deber a aumento de captación por las fibras musculares; al respecto se ha sugerido que la traslocación del transportador GLUT4 desde un almacenamiento intracelular hacia la membrana celular está significativamente mejorado después de 30 min de EBF (**citado en Cadefau et al., 1993**).

Lo anterior se relaciona con un aumento del lactato, aumenta aproximadamente 8 veces (1 min), lo cual indica que la mayor fuente de producción del lactato proviene del glucógeno. Sin embargo, a los 30 min el lactato no es diferente del control. La menor concentración de lactato se podría relacionar con que los mecanismos para eliminarlo funcionan mejor.

Con la prueba de fatiga muscular el grupo que tuvo el IF más bajo fue el 15'30'', hasta el momento el análisis de posibles causas metabólicas que expliquen esta fatiga nos presenta un grupo que, si bien es cierto, tiene unos niveles de glucógeno más bajos que el control aún conserva depósitos de glucógeno, la glucosa disponible es alta y el lactato es igual que el control. De manera que en base a estos tres metabolitos no hay causas para explicar la fatiga muscular, pero sí tiene el nivel más bajo de ATP.

La estimulación a 10 Hz produce pronunciados cambios en el glucógeno total, glucosa, Glu6P, Fru6P, Fru1,6P₂, DHAP, Gli3P, piruvato y lactato, lo que sugiere modificación del flujo glucogenolítico y glucolítico.

Efectivamente, mediante la ecuación propuesta por Spriet y colaboradores (**Spriet et al., 1987**) se determinó que la estimulación a 10 Hz produjo aumento de la glucogenólisis desde los 20 s hasta los 5 min, sin embargo, a los 15 y 30 min disminuye drásticamente quedando en valores similares al control que se halla en situación de descanso. Esto se correlaciona con la disminución progresiva del glucógeno, que se estabiliza desde los 5 min. En la medida que aumenta el tiempo de estimulación el aporte de la glucogenólisis se torna menos importante. El descanso permite que sólo después de 3 h se alcancen valores similares al control; el nuevo realmacenamiento, sin embargo, no es suficiente para que la glucogenólisis esté en condiciones de abastecer a las fibras musculares para responder a un nuevo tiempo de estimulación de 20 s, lo que es evidente en los grupos 15'30''20'' y 30'30''20''.

El uso de la glucólisis mostró un comportamiento similar al de la glucogenólisis reforzando la fatiga del grupo 15'30'', que indica que con 15 min de estimulación la fatiga debe ser muy importante. El descanso no permite que la glucólisis se recupere para sostener un nuevo trabajo, cuando se dan los 20 s finales, por lo tanto hay fatiga.

El menor uso de la glucogenólisis y de la glucólisis hace sospechar que la fatiga muscular no sólo podría ser explicada por un desacoplamiento excitación-contracción, sino que además puede tener como fundamento justamente la menor utilización de la glucogenólisis y la glucólisis, que en definitiva conducen a menor disponibilidad de ATP.

El uso del ATP, calculado según la ecuación propuesta (**Katz et al., 1986**) mostró un uso cada vez menor en la medida que aumenta el tiempo de estimulación, con esto se confirma que la menor disponibilidad de ATP para el trabajo contráctil se relaciona con un menor uso de la glucogenólisis y glucólisis.

La posibilidad de que la fatiga muscular tenga como fundamento una fatiga metabólica demuestra que el tiempo de descanso no fue suficiente para la recuperación de las fibras musculares, especialmente de las tipo

IID. La EBF produce fatiga de larga duración que necesita mucho más de 3 h de descanso para la recuperación (**Edwards et al., 1977b; Cadefau et al., 1993**).

El pH disminuye significativamente en casi todos los tiempos de estimulación. Esta disminución se atribuye al aumento del lactato. La disminución del pH podría estar relacionada con la aparición de fatiga muscular, sin embargo, antecedentes previos muestran que el efecto de una disminución del pH es todavía polémico. Se ha comunicado que aumentos de la concentración de H^+ deprime la fuerza y reduce la velocidad de la contracción en fibras aisladas y desolladas (**Myburgh & Cooke, 1997**), también se ha observado que efectos inhibitorios del pH sobre el desarrollo de fuerza son menores en la medida que aumenta la temperatura, a $30^{\circ}C$ disminuye a un 18 % (**Dibold & Fitts, 2000; Pate et al., 1995**), de manera que a temperaturas fisiológicas se esperaría una menor influencia del pH. La influencia de los H^+ se ha estudiado en conjunto con fosfato inorgánico y se ha observado que disminuyen el desarrollo de fuerza (**Cooke & Pate, 1985**) pero, aparentemente, es el fosfato inorgánico el que inhibe el golpe de potencia (**Chinn et al., 2000**). Con el descanso el valor del pH retorna al valor del grupo control, más aún, en el grupo más fatigado 15'30' el pH fue de 6,95, valor igual al grupo control. Por lo tanto, de acuerdo a los datos obtenidos, el pH no fue una variable a la cual pudiera atribuírsele una participación en la fatiga muscular. La capacidad del sistema y de las fibras musculares en particular demostraron una buena capacidad para regular el pH.

También es posible que el ADP tenga algún grado de participación en la aparición de fatiga muscular. En nuestros experimentos la concentración de ADP está más baja en el grupo 15'30' comparado con el control. Hay antecedentes que sugieren que el ADP no parece ser un causante potencial de fatiga metabólica en concentraciones fisiológicas (**Cooke & Pate, 1985; Kentish, 1986**).

La participación de nucleótidos como ATP, ADP y AMP en la génesis de fatiga muscular se ha visto que va por el lado de su influencia sobre la excitabilidad de las células musculares. Una disminución de ellos induce un disminución de la excitabilidad y por ende en una incapacidad de la célula para excitarse. En nuestros experimentos ATP está muy disminuído, por lo tanto, la falta de excitabilidad podría quizá ser la causa fundamental de la fatiga muscular.

HIPOTESIS SOBRE LA INSTAURACIÓN DE LA FATIGA DE CORTA Y LARGA DURACIÓN

La concentración de ATP en la fibra muscular es muy importante porque proporciona la energía necesaria para los procesos vitales de la contracción, suplementos energético para la misma y mantenimiento de la actividad de transportadores iónico, que mantendrán el equilibrio osmótico de la fibra muscular. El ATP también puede actuar como molécula reguladora (**Dutka and Lamb, 2004**).

La concentración del ATP (7-8 mM) en el músculo en reposo se mantiene próxima a esta concentración en la mayoría de las circunstancias, mediante la glucólisis aeróbica y anaeróbica y, a corto plazo por la reacción catalizada por la creatina quinasa, la cual utiliza las altas concentraciones de PCr normalmente presentes (20 mM). Sin embargo, se ha visto que cuando el músculo entra en condiciones de fatiga el ATP disminuye drásticamente, especialmente en las fibras de tipo II (1,5 - 2 mM). Este hecho hace plantearse varias cuestiones.

1.-¿Qué efecto tienen estas bajas concentraciones de ATP sobre los diferentes pasos del proceso del acoplamiento excitación-contracción y la contracción?. 2.-¿Cómo puede afectar a la fatiga de corta y larga duración?.

Durante la homeostasis de la fibra muscular, mientras la demanda de ATP esté equilibrada con su recuperación, a partir de las diferentes fuentes energéticas, no se produce la fatiga. Pero cuando una actividad repetitiva o extenuante produce una caída de la fuerza muscular, el estado metabólico del citoplasma cambia, esto se debe a una utilización muy elevada de ATP que a su vez depende de las contribuciones relativas de las vías de resíntesis aeróbicas y anaeróbicas de ATP, produciéndose cambios como la disminución de PCr, ATP y glucógeno y aumento en los niveles de Pi, ADP, AMP, IMP y lactato.

Mientras el ejercicio mantiene una demanda de ATP equilibrada con su resíntesis, el AMP, a través de la actividad AMP quinasa, parece tener un papel predominante en facilitar la entrada de glucosa exógena, vía estimular la translocación del transportador de glucosa GLUT4 y activar el mecanismo de oxidación de ácidos grasos y disminuir la síntesis de glucógeno. La activación de esta AMP quinasa ocurre en respuesta a una disminución de PCr, ATP y a un aumento de AMP y, actúa como un mecanismo de retroalimentación que ajusta el suplemento de ATP con la demanda (**Hardie, 2004**).

En nuestros experimentos de electroestimulación de un músculo rápido muy fatigable, se observa un aumento progresivo de la fatiga el que va acompañado de una disminución de las fuentes energéticas ATP, PCr y glucógeno. El descanso recupera bien los valores de PCr y casi los de glucógeno, pero no los de creatina total en corto tiempo y los de ATP durante todo el proceso estudiado.

Después de 1' de estimulación se observa que la condición de restauración del equilibrio metabólico se consigue después de una recuperación de 30' gracias a la recuperación de la PCr, aunque el ATP ya disminuye significativamente. Sin embargo, en nuestros experimentos, a partir de estimulaciones de 5' y recuperaciones posteriores de 30' se observan dos efectos: 1.-El primero es un descenso de ATP, que ya se ha producido a partir del minuto y que no se recupera después de 3h de descanso y que genera un índice de fatiga significativamente bajo a los 15'30''. 2.-El segundo es un descenso no sólo en la PCr sino que también en la creatina total.

En el primer caso, la disminución de ATP posiblemente se deba a un aumento importante de IMP y este se desamina por la AMP deaminasa aumentando la concentración de ión amonio en la fibra. El producto desaminado, la adenosina, puede ser desfosforilado por 5'-nucleotidasa y ser degradado hasta urato en el hígado, con lo cual se pierden nucleótidos por la célula muscular. Sin embargo, en el músculo existe el ciclo de

Lowenstein (**Lowenstein, 1972**), con una cierta capacidad de recuperación de nucleótidos, durante el cual el IMP puede ser recuperado hasta AMP por las enzimas adenilato succinato sintetasa y adenilato succinato liasa, que pertenecen al ciclo y que presentan actividades muy bajas. En nuestra situación, de alta demanda de ATP, podrían hallarse saturados y con una incapacidad de recuperación de todos los nucleótidos. Ello daría paso a una pérdida de nucleótidos, en forma de IMP y adenosina, no de recuperación inmediata, sino a partir de la de síntesis de nuevos nucleótidos de adenina, que exige un período de tiempo más largo. En el segundo caso, aparece también una pérdida de creatina total, lo cual hace suponer que se ha perdido por la célula muscular en forma de creatina. La regeneración de PCr a partir de creatina es muy rápida y parece tener prioridad sobre la restitución de creatina total. Sin embargo, la reposición de la creatina muscular, que es sintetizada por el hígado, es relativamente rápida.

La baja disponibilidad de ATP afectará a otros sistemas, especialmente a los canales iónicos. Cinco transportadores están afectados principalmente: en el RS, el canal de Ca^{2+} y la Ca^{2+} -ATPasa y, en el sarcolema la Na^+ - K^+ ATPasa, el canal de K^+ sensible a voltaje y el canal de Cl^- sensible a voltaje (CIC⁻).

Cuando el ATP disminuye, la Ca^{2+} -ATPasa disminuiría su actividad. Una caída muy importante conduciría a un aumento del Ca^{2+} citoplasmático, al rigor muscular y a lesión y necrosis muscular dependiente de Ca^{2+} (**Westerblad y col, 1998; Lamb y col. 1995**). Esto no ocurre normalmente porque la generación de fuerza y el consumo de ATP disminuyen durante el ejercicio, comprometiendo la función muscular a corto plazo, pero protegiendo a las células de que queden metabólicamente exahustas. Este proceso es el de la fatiga en el que los factores que contribuyen son todavía controvertidos.

Una reducción de la fuerza es uno de los primeros factores que anuncian la fatiga (**Westerblad y col. 1998, Debold y col. 2004**), pero una reducción significativa en el consumo de ATP sólo ocurre con una reducción de la liberación de Ca^{2+} , que se concretará más tarde en fatiga y que se correlaciona con una depleción de ATP (**Westerblad y col. 1998**). Por tanto, una depleción de ATP y un aumento en el Mg^{2+} citoplasmático, reduce directamente la actividad de la liberación de Ca^{2+} por el RS y puede conducir a fatiga. Una reducción en la excitación eléctrica que estimula la liberación de Ca^{2+} por el RS será un contribuyente importante en la fatiga.

La activación del músculo esquelético se inicia a nivel de la unión neuromuscular por el receptor nicotínico de acetilcolina. El neurotransmisor depolariza la membrana por ingreso de Na^+ al sarcoplasma. La repolarización es mediatizada por salida K^+ y por ingreso de Cl^- a través de canales de K^+ y Cl^- (CIC-1), ambos sensibles al voltaje (**Jentsch y col. 2002**), activados por la depolarización de la membrana. Una proporción significativa de CIC-1 están abiertos en el músculo en reposo, actuando como barrera a la despolarización que puede ocurrir por potenciales de acción. Los potenciales de acción se propagan por la superficie del sarcolema membrana y de los túbulos T. En los túbulos T hay receptores de DHPR (canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje), que al activarse estimulan la liberación de Ca^{2+} del RS. Se cree que durante el ejercicio intenso el gradiente de

Na^+ - K^+ en el volumen restringido de los túbulos T se reduce y, esto reduciría la propagación del potencial de acción y contribuiría a la fatiga (**Sejersted y Sjogaard, 2000**).

Los canales de K^+ sensibles a ATP proporcionan un mecanismo para relacionar la excitabilidad con el estado metabólico y, aunque estos canales reducen la excitabilidad y protegen a las células cardíacas durante la isquemia, no parece que contribuyan significativamente a la reducción de fuerza durante la fatiga en el músculo esquelético según Gong (**Gong et al., 2000**), pero sí según Rodrigo y Standen (**Rodrigo & Standen, 2005**). En cambio los CIC-1 son importantes reguladores de la excitabilidad del músculo esquelético y, muy recientemente (**Bennetts et al., 2005**) se ha demostrado que estos canales se modulan por ATP. La elevada concentración de ATP en el músculo en reposo los inhibe disminuyendo su sensibilidad al voltaje a potenciales positivos. El ADP y ATP tienen efectos similares, pero el IMP no tiene efecto, indicando que la inhibición de CIC-1 desaparecería sólo bajo condiciones anaeróbicas tan intensas como la actividad muscular muy intensa o la isquemia, cuando el ATP se halla depletado o se acumula IMP. La actividad aumentada de CIC-1 en estas condiciones reduciría la excitabilidad muscular contribuyendo a la fatiga.

Al respecto recordamos que en nuestros registros de potencial de acción compuesto del músculo esquelético u onda M, la amplitud de esta onda fue significativamente menor en todos los tiempos de estimulación (5', 15' y 30') y que se mantuvo en esta condición después de 3 h de descanso. La menor amplitud de la onda M se debe a que ciertas poblaciones de fibras musculares, probablemente las IIB, no respondieron a la estimulación debido a que la estimulación previa (5', 15' y 30') provocó una disminución de su excitabilidad. Esta disminución de la excitabilidad puede estar relacionada a canales de cloro voltaje dependientes del tipo CIC-1. Al respecto se ha comunicado (**Bennetts et al., 2005**) que cuando las fibras musculares son sometidas a una estimulación que disminuye notablemente la concentración de ATP, dichos canales aumentan su actividad permitiendo el ingreso de iones Cl^- a la célula, con lo cual el interior de la membrana se torna más negativo, es decir, se hiperpolariza. Esto provoca una disminución de la excitabilidad celular impidiendo la generación de potencial de acción y por ende de la actividad contráctil posterior, es decir, la célula muscular entra en un estado de fatiga. Esto es muy conveniente para la célula muscular porque la protege contra ulteriores contracciones, lo cual significaría pérdidas de ATP y acumulación de Ca^{2+} , lo cual podría provocar un daño irreversible. Significa entonces que las células musculares, al entrar en fatiga, tendrán tiempo suficiente para restablecer sus niveles de sustratos energéticos que conduzcan de nuevo al restablecimiento de los niveles de ATP. Llegada esta situación, por efecto de ATP, los canales de cloro CIC-1 vuelven a inhibirse lo que permite a la célula recobrar su estado de excitabilidad original. En nuestros experimentos después de 3 h de descanso esto no ha ocurrido.

La repolarización aumentada de la membrana inhibiría la actividad del receptor de DHP y también la activación del canal de Ca^{2+} del RS, con lo cual disminuirían los niveles de Ca^{2+} libre citosólico, se deprimiría la activación de las miofibrillas, la contracción y se instauraría una fatiga progresiva que conduciría a una recuperación lenta del mecanismo de excitación-contracción.

Hay que comentar que con 30' de estimulación los niveles de Ca^{2+} citoplasmático todavía no se han modificado significativamente (**Frías et al., 2006**), lo que supone que la estructura de las membranas continúa intacta, tal y como se demuestra en los patrones normales de los gradientes de sacarosa de las fracciones de RS. Durante estos 30 min, no hay todavía lesiones importantes de RS, pero el déficit o pérdida de nucleótidos ya se ha iniciado, habiendo una incapacidad para resintetizarlos de manera inmediata.

Si la estimulación continúa más allá de los 30', y la demanda de ATP continúa por encima de su capacidad de restauración a través de una electroestimulación crónica más prolongada, se afecta el equilibrio iónico $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ por insuficiencia en la actividad de la bomba (**Green, 2004**) y, las membranas se deterioran hasta llegar a una alteración en su estructura después de 24 h de estimulación, tal y como lo han descrito Frías y colaboradores (**Frías et al., 2005**). Sin embargo, aunque se presenten alteraciones en el RS, visibles incluso al microscopio electrónico, el músculo es capaz de recuperarse después de 48 h de descanso.

También se ha descrito una pérdida de ATP por la fibra muscular en forma de nucleótidos de adenina. Hoy día se sabe de la existencia de receptores purinérgicos en el endotelio vascular, que pueden unir ATP y sus derivados y de cuya unión resulta una vasodilatación. Hay varios mecanismos en el metabolismo del ATP que indican que no sólo se modula el aporte de ATP, sino también la demanda y, estos mecanismos son operativos en la periferia del músculo esquelético en ejercicio, sin necesidad de intervención del SNC (**Myburg, 2005**).

El papel central del ATP como sensor energético y como modulador de la actividad de transporte de canales de K^+ y Cl^- lo hacen principalmente responsable del inicio de la fatiga, a nivel de una disminución del acoplamiento excitación-contracción, para evitar un deterioro celular posterior.

Por todo ello, proponemos una diferenciación molecular entre la fatiga de corta y larga duración, que hasta ahora se diferenciaban por el tiempo transcurrido para su recuperación.

La fatiga de corta duración se produciría por causas metabólicas, inducida por un déficit de ATP, que desacoplaría el sistema de excitación-contracción en las fibras rápidas, hasta restaurar los niveles de ATP, pero sin que se produjeran cambios visibles en la estructura del RS. Su recuperación sería dependiente de la restauración de los niveles de ATP correspondientes a la situación de descanso muscular. La fatiga de larga duración inicialmente también se produce por un déficit de ATP, pero luego se produciría por una desorganización en la estructura del RS, que, aunque reversible, tardaría más tiempo en recuperarse. Su recuperación sería dependiente de la restauración de los niveles de ATP correspondientes pero, también de la reorganización del sistema del RS implicado en la excitación-contracción.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

- 1.-La estimulación a 10 Hz durante 1 y 5 min produce una fatiga que se recupera parcialmente con 30 min de descanso, restaurándose los niveles iniciales de PCr, Glucógeno (a las 3h), glucosa (a las 3h), piruvato, lactato. Las fibras tipo IIB parecen recuperarse.
- 2.-La fatiga se caracteriza por una falta de participación de fibras IIB a partir de los 5 min de estimulación, pero se mantiene la actividad contráctil de las tipo IIA.
- 3.-La estimulación a 10 Hz durante 15 y 30 min produce una disminución significativa del índice de fatiga que implica fatiga de corta duración en un músculo de contracción rápida, la que se restablece parcialmente después de 3 h de descanso.
- 4.-La aparición de fatiga de fibras IIA y IIB no es causada por alteraciones del RS, en los tiempos estudiados.
- 5.-La aparición de fatiga de fibras IIA y IIB no es causada por el efecto de radicales libres sobre membranas de RS en los primeros minutos, si bien a los 30 min hay tanto aumento significativo de MDA como disminución significativa del índice de fatiga, ambos hechos pueden estar relacionados, lo que hace sospechar que la producción de MDA comienza a partir de este tiempo.
- 6.-La fatiga inicialmente se correlaciona con la baja concentración de ATP y de glucógeno en sus dos formas, proglucógeno y macroglucógeno.
- 7.-La producción de lactato y la bajada de pH no son las causas de la fatiga, ya que se regeneran antes de la recuperación de la fatiga.
- 8.-La disminución significativa de ATP se ve acompañada de una disminución significativa de la onda M. La menor amplitud de la onda M se puede deber a que ciertas poblaciones de fibras musculares no generan potencial de acción. Estas fibras pueden ser las que quedan refractarias a la estimulación. Dicha refractariedad puede estar relacionada con la variación de los niveles de nucleótidos en las fibras musculares y, el efecto de esta variación modularía los canales y bombas electrogénicas de sarcolema y membrana de RS para dos objetivos: lograr potenciales de reposo y de acción adecuados y mantener unos niveles de Ca^{2+} adecuados en el sarcoplasma para proteger a la fibra de las lesiones que puede comportar una electroestimulación continuada.
- 9.-Las causas de la fatiga que aparece tempranamente tienen un origen metabólico tanto en la fatiga de corta como de larga duración, presentando grados diferentes de anomalías metabólicas y estructurales durante su instauración, pero su recuperación total requiere la normalización de las concentraciones de ATP en las fibras.

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

- Aigner S**, Gohlsch B, Hämäläinen N, Staron R, Uber A, Wehrle U, Pette D (1993) Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain IID, not IIB predominates. *Eur. J. Biochem.* 211: 367-372.
- Aikawa K**, Quintanilha A, De Lumen B, Brooks G, Packer L (1984) Exercise endurance training alters vitamin E tissue level and red blood cell hemolysis in rodents. *Biosci. Rep.* 4: 253-257.
- Alonzo M**, Lomako J, Lomako W, Whelan W (1995) A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* 9(12): 1126-1137.
- Allesio H**, Goldfarb A (1988) Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise. *J. Appl. Physiol.* 64: 1333-1336.
- Andrade F**, Reid M, Allen D, Westerblad H (1998) Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J. Physiol. (London)* 509(2): 565-575.
- Anzai K**, Ogawa K, Ozawa T, Yamamoto H (2000) Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. *Antiox. Redox Signal* 2: 35-40.
- Baker A**, Kostov K, Miller R, Weiner M (1993) Slow force recovery after long duration exercise: metabolic and activation factors in muscle fatigue. *J. Appl. Physiol.* 74: 2294-2300.
- Balon T** (1999) Integrative biology of nitric oxide and exercise. *Exer. Sport Sci. Rev.* 27: 218-253.
- Barja de Quiroga G** (1997) Radicales libres y antioxidantes. *Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo*. Real Academia de Farmacia. Madrid, pp. 21-44.
- Beaumont E**, Gardiner P (2002) Effects of daily spontaneous running on the electrophysiological properties of hindlimb motoneurons in rats. *J. Physiol.* 540.1: 129-138.
- Bejma J**, Ramírez P, Donahue C, Ji L (1998) Aging and acute exercise enhances free radical generation and oxidative damage in skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exer.* 30(Suppl): 322.
- Bejma J**, Ramírez P, Ji L (1999) Hepatic free radical generation and oxidative stress in aged and exercise rats. *Med. Sci. Sports Exer.* 31(Suppl): 52.
- Benderitter M**, Hadj-Saad F, Lhuissier M (1996) Effects of exhaustive exercise and vitamin B6 deficiency of free radical oxidative process in male trained rats. *Free Rad. Biol. Med.* 21: 541-549.
- Bennetts B**, Rychov G, NG Hooi-Ling, Morton C, Stapleton D, Parker M, Cromer B (2005) Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle CLC-1 chloride channels. *J. Biol. Chem.* 280: 32452-32458.
- Bert M**, Klebl T, Ayoub A, Pette D (1998) Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett.* 422: 381-384.
- Binder M**, Heckman C, Powers R (1996) The physiological control of motoneuron activity. In *Handbook of Physiology 12: Exercise, Regulation and Integration of Multiple System*, ed. Rowell L and Shepherd J., pp. 3-53. Oxford University Press, New York.
- Booth F**, Thompson D (1991) Molecular and cellular adaption of muscle in response to exercise: perspective of various models. *Physiol.Rev.* 71: 1-45.

- Bowles D**, Torgan C, Ebner S, Kehrer J, Ivy J, Starnes J (1991) Effects of acute submaximal exercise on skeletal muscle vitamin E. *Free Radic. Res. Commun.* 14(2): 139-143.
- Bray D**, Rayns D (1976) A comparative freeze-etch study of the sarcoplasmic reticulum of avian fast and slow muscle fibres. *J. Ultrastruct. Res.* 57: 251.
- Brooke M**, Kaiser K (1970) Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 670-672.
- Brown J**, Henriksson J, Salmons S (1989) Restoration of fast muscle characteristics following cessation of chronic stimulation: Physiological, histochemical and metabolic changes during slow-to-fast transformation. *Proc. R. Soc. Lond.* 235:321-346.
- Buchthal F**, Schmalbruch H (1980) Motor unit of mammalian muscle. *Physiol. Rev.* 60: 90-142.
- Burke R**, Levine D, Tsairis P, Zajac F (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol.(Lond)* 234: 723-748.
- Burke R** (1974) The correlation of physiological properties with histochemical characteristics in single muscle units. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 228: 145-159.
- Burke R**, Levine D, Saleman M, Tsairis P (1974b) Motor units in cat soleus muscle: Physiological, histochemical and morphological characteristics. *J. Physiol. (Lond.)* 238: 503-514).
- Burke R**, Strick P, Kanda K, Kim C, Walmsley B (1977) Anatomy of mediae gastrocnemius and soleus motor nuclei in cat spinal cord. *J. Neurophysiol.* 40: 667-680.
- Burke R** (1981) Motor units: anatomy, physiology and functional organization. J.M. Brookhart and V.B. Mountcastle (Eds) In: *Handbook of Physiology. The Nervous System. Motor Control.* Bethesda, MD: American Physiological Society, sect. 1, vol. 2, part 1, chapt. 10, pp. 345-422.
- Burke R**, Dum R, Fleshman J, Glenn L, Lev-Tov A, O'Donovan M, Pinter M (1982) An HRP study of the relation between cell size and motor unit type in cat ankle extensor motoneurons. *J. Comp. Neurol.* 209: 17-28.
- Byrd S**, Bode A, Klug G (1989a) Effects of exercise of varying duration on sarcoplasmic reticulum function. *J. Appl. Physiol.* 66: 1383-1388.
- Byrd S**, McCutcheon L, Hodgson D, Gollnick P (1989b) Altered sarcoplasmic reticulum function after high-intensity exercise. *J. Appl. Physiol.* 67: 2072-2077.
- Byrd S** (1992) Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. *Med. Sci. Sports Exer.* 24(5): 531-536.
- Cadefau J** (1992) Adaptabilitat del múscul esquelètic a l'exercici de curta durada: metabolisme energetic. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina.
- Cadefau J**, Parra J, Cussó R, Heine G, Pette D (1993) Responses of fatigable and fatigue-resistant fibres of rabbit muscle to low-frequency stimulation. *Pflügers Arch.* 424: 529-537.
- Castilho R**, Carvalho-Alves P, Vercesi A, Ferreira S (1996) Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump induced by Fe^{2+} / H_2O_2 / ascorbate is not mediated by lipid peroxidation or thiol oxidation and leads to protein fragmentation. *Mol. Cell. Biochem.* 21; 159(2): 105-114.
- Chance B**, Leigh J, Kent J, McCully K, Nioka S, Clark B, Maris J, Graham T (1986) Multiple controls of oxidative metabolism of living tissues as studied by ^{31}P MRS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9458-9462.

- Child R**, Wilkinson D, Fallowfield J, Chen A (1998) Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a stimulated half-marathon run. *Med. Sci. Sports Exer.* 30(11): 1603-1607.
- Chin E**, Allen D (1996) The role of elevations in intracellular [Ca²⁺] in the development of low frequency fatigue in mouse single muscle fibres. *J. Physiol.* 491(Pt3): 813-824.
- Chinn M**, Myburgh K, Pham T, Franks-Skiba K, Cooke R (2000) The effect of polyethylene glycol on the mechanics and ATPase activity of active muscle fibers. *Biophys. J.* 78: 927-939.
- Clausen T**, Nielsen O (1994) The Na⁺-K⁺-pump and muscle contractility. *Acta Physiol. Scand.* 152: 365-373.
- Cohen G**, Heikkila R (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamina dialuric acid and related agents. *J. Biol. Chem.* 249: 2447-2450.
- Cooke R**, Pate E (1985) The effects of ADP and phosphate on the contraction of muscle fibers. *Biophys. J.* 48: 789-798.
- Cope T**, Bodine S, Fournier M, Edgerton V (1986) Soleus motor unit in chronic spinal transected cats: physiological and morphological alterations. *J. Neurophysiol.* 55: 1202-1220.
- Davies K**, Quintanilla T, Brooks G, Packer L (1982) Free radical and tissue damage produced produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 107: 1198-1205.
- Dawson M**, Gadian D, Wilkie D (1978) Muscular fatigue investigated by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Nature (Lond)* 274: 861-866.
- Debold E**, Dave H, Fitts R (2004) The fiber type and temperature dependence of inorganic phosphate: the implications for fatigue. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287: C673-C681.
- Delp M**, Pette D (1994) Morphological changes during fiber type transitions in low-frequency stimulated rat fast-twitch muscle. *Cell Tissue Res.* 277: 363-371.
- Demopoulos H**, Santomier J, Seligman M, Pietronigro D (1986) Free radical pathology: rationale and toxicology of antioxidants and other supplements in sports medicine and exercise science. *Sport, Health and Nutrition.* Katch F (Ed.). Champaign, IL: Human Kinetics Publisher, pp. 139-189.
- Desai N**, Rutherford L, Turrigiano G (1999) Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nature Neurosci.* 2: 515-520.
- Deskur E**, Przywarska I, Dylewicz P, Szczesniak L, Rychlewski T, Wilk M, Wysocki H (1998) Exercise-induced increase in hydrogen peroxide plasma levels is diminished by endurance training after myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 67(3): 219-224.
- Dibold E**, Fitts R (2000) The effects of temperature and Pi on single muscle fiber contractile properties. *Biophysics J.* 78: 119a.
- Dluzen D**, Liu B, Chen C, Dicarlo S (1995) Daily spontaneous running alters behavioral and neurochemical indexes of nigrostriatal function. *J. Appl. Physiol.* 78: 1219-1224.
- Ducrocq C**, Blanchard B, Pignatelli B, Ohshima H (1999) Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 1068-1077.
- Dudley G**, Abraham W, Terjung R (1982) Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 53: 844-850.
- Dutka T**, Lamb G (2004) Effect of low cytoplasmic [ATP] on excitation-contraction coupling in fast-twitch muscle fibres of the rat. *J. Physiol.* 560: 451-468.

- Dux L**, Green H, Pette D (1990) Chronic low-frequency stimulation of rabbit fast-twitch muscle induces partial inactivation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and changes in its tryptic cleavage. *Eur. J. Biochem.* 192: 95-100.
- Edstrom L**, Kugelberg E (1968) Histochemical composition, distribution of fibres and fatigability of single motor units. *J. Neurol. Neurosug. Psychiat.* 31: 424-433.
- Edwards R**, Hill D, Jones D, Merton P (1977a) Fatigue of long duration in human skeletal muscle after exercise. *J. Physiol. (Lond)* 272(3): 769-778.
- Edwards R**, Young A, Hosking G, Jones D (1977b) Human skeletal muscle function: description of test and normal values. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52: 283-290.
- Edwards R** (1982) Biochemical bases of fatigue in exercise performance: catastrophe theory of muscular fatigue. In: HG, Knuttgen, JH Vogel and JH Poortmaas (Eds.). *International Series of Sports Science* 13: 3-28. Boston: Biochemistry Exercise.
- Eisen A**, Carpenter S, Karpati G, Bellavance A (1973) The effect of hyper- and hypoactivity upon fibre diameters of intact and regenerating nerves. *J. Neurol.* 20:457-469.
- Eisenberg B**, Salmons S (1981) The reorganization of subcellular structure in muscle undergoing fast-to-slow type transformation: a stereologic study. *Cell Tissue Res.* 220: 449-471.
- Eisenberg B** (1983) Quantitative ultrastructure of mammalian skeletal muscle. L. D. Peachey, R. H. Adrian and S. R. Geiger (eds). *Handbook of Physiology: Skeletal Muscle*. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 73-112.
- Eisenberg B**, Brown J, Salmons S (1984) Restoration of fast muscle characteristics following cessation of chronic stimulation. The ultrastructure of slow-to-fast transformation. *Cell Tissue Res.* 238: 221-230.
- Fishbach G**, Robbins N (1969) Changes in contractile properties of disused muscles. *J. Physiol. (Lond.)* 201: 305-320.
- Fitts R**, Courtwright J, Kim D, Witzmann F (1982) Muscle fatigue with prolonged exercise: contractile and biochemical alterations. *Am. J. Physiol.* 242: C65-C73.
- Flecknell P** (1987) In: *Laboratory Animal Anaesthesia. An introduction for research workers and technicians*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
- Fleshman J**, Munson J, Sybert G, Friedman W (1981) Rheobase, input resistance, and motor-unit type in medial gastrocnemius motoneurons in the cat. *J. Neurophysiol.* 46(6): 1326-1338.
- Foehring R**, Sybert G, Munson J (1986) Properties of self-reinnervated motor units of medial gastrocnemius of cat. I. Long-term reinnervation. *J. Neurophysiol.* 55: 931-946.
- Foehring R**, Sybert G, Munson J (1987) Motor-unit properties following cross-reinnervation of cat lateral gastrocnemius and soleus muscles with medial gastrocnemius nerve. II. Influence of muscle on motoneurons. *J. Neurophysiol.* 57: 1227-1245.
- Freund H** (1983) Motor unit and muscle activity in voluntary motor control. *Physiol.Rev.* 63: 387-436.
- Frias J**, Cadefau J, Prats C, Morán M, Megías A, Cussó R (2005) Disturbances of the sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system in 24-h electrostimulated fast-twitch skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1668: 64-74.
- Frias J**, Cadefau J, Prats C, Rovira J, Deulofeu R, Cussó R (2006) Recovery of a long-term fatigue produced by muscle chronic-low frequency stimulation. *En preparación*.
- Friede R** (1972 a) Control of myelin formation by axon caliber (whit a model of the control mechanism). *J. Comp. Neurol.* 144(2): 233-252.

- Friede R** (1972 b) Adjustment of the myelin sheath to changes in axon caliber. *Anat. Rec.* 172(1): 1-14.
- Fryer M**, Owen V, Lamb G, Stephenson D (1995) Effects of creatine phosphate and P_i on Ca^{2+} movements and tension development in rat skinned skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond)* 482: 123-140.
- Gardiner P** (1993) Physiological properties of motoneurons innervating different muscle unit types in rat gastrocnemius. *J. Neurophysiol.* 69: 1160-1170.
- Gassel M**, Diamantopoulos E (1977) The Jendrassik maneuver. II. An analysis of the mechanism. *Neurology, Minneap.* 14: 640-642.
- Gharakhanlou R**, Chadan S, Gardiner P (1999) Increased activity in the form of endurance training increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies and in sciatic nerve in the rat. *Neuroscience* 89: 1229-1239.
- Gibala M**, Lozej M, Tarnopolsky M, McLean C, Graham T (1999) Low glycogen and branched-chain amino acid ingestion do not impair anaplerosis during exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 87: 1662-1667.
- Gillespie M**, Gordon T, Murphy P (1986) Reinnervation of the lateral gastrocnemius and soleus muscles in the rat by their common nerve. *J. Physiol. (Lond)* 372: 485-500.
- Gissel H**, Clausen T (1999) Excitation-induced Ca^{2+} uptake in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 276: R331-R339.
- Goldfarb A** (1993) Antioxidant: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exer.* 25: 232-236.
- Gollnick P**, Hodgson D. (1986) The identification of fiber types in skeletal muscle: a continual dilemma. *Exer. Sports Sci.* 14: 81-104.
- Gong B**, Miki T, Seino S, Renaud J (2000) A K (ATP) channel deficiency affects resting tension, not contractile force, during fatigue in skeletal muscle. *Am J. Physiol.* 279, C1351-C1358.
- Gómez-Pinilla F**, Ying Z, Opazo P, Roy R, Edgerton V (2001) Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur. J. Neurosci.* 13: 1078-1084.
- González M**, Collins W (1997) Modulation of motoneuron excitability by brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurophysiol.* 77: 502-506.
- Green H**, Cadefau J, Pette D (1991) Altered glucose 1,6-bisphosphate and fructose 2,6-bisphosphate levels in low-frequency stimulated rabbit fast-twitch muscle. *FEBS Lett* 282(1): 107-109.
- Green H**, Düsterhöft S, Dux L, Pette D (1992a) Metabolite patterns related to exhaustion, recovery and transformation of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Pflügers Arch.* 420: 359-366.
- Green H**, Ball-Burnett M, Chin E, Dux L, Pette D (1992b) Time dependent increases in Na^+ - K^+ -ATPase concentration of low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett.* 310: 129-131.
- Green H**, Pette D (1997) Early metabolic adaptations of rabbit fast-twitch muscle to chronic low-frequency stimulation. *Eur. J. Appl. Physiol.* 75: 418-424.
- Green H** (2004) Membrane excitability, weakness, and fatigue. *Can. J. Appl. Physiol.* 29: 291-307.
- Gustafsson B** (1974) Afterhyperpolarization and the control of repetitive firing in spinal neurones of the cat. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 416:1-47.
- Guth L**, Samaha F (1970) Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.* 28: 365-367.
- Hämäläinen N**, Pette D (1993) The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID and IIA in skeletal muscles of mouse, rat and rabbit. *J. Histochem Cytochem.* 51: 733-743.

- Hara M**, Abe M, Suzuki T, Reiter R (1996) Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin. *Pharmacol. & Toxycol.* 78: 308-312.
- Hardie G** (2004) AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic response to exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36: 28-34.
- Harris R**, Hultman E, Nordesjo L (1974) Glycolytic intermediates and high energy phosphates determined in biopsy samples of musculus femoris of man at rest. Methods and variance of values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 33: 102-120.
- Heilmann C**, Müller W, Pette D (1981) Correlation between ultrastructural and functional changes in sarcoplasmic reticulum during chronic stimulation of fast muscle. *J. Membr. Biol.* 59: 143-149.
- Henneman E**, Olson C (1965) Relations between the structure and function in the desing of skeletal muscles. *J. Neurophysiol.* 28:581-598.
- Henneman E**, Mendell L (1981) Functional organization of the motoneurone pool and its inputs. V.B. Brooks and S.R. Geiger (eds). *Handbook of Physiology. Section I. The Nervous System. Vol. 2. Motor Control. Part I.* Bethesda, MD: American Physiological Society, pp. 423-508.
- Hicks A**, Ohlendieck K, Göpel S, Pette D (1997) Early functional and biochemical adaptations to low-frequency stimulation of rabbit fast-twitch muscle. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol 42)* 273: C297-C305.
- Hicks J** (2001) *Bioquímica*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. Parte IV: Endocrinología Molecular y Bioquímica Especial. Capítulo 40: Radicales Libres de Oxígeno: Bioquímica inorgánica y biomedicina, pp. 779-792.
- Hu P**, Yin C, Zhang K, Wright L, Nixon T, Wechsler A, Spratt J, Briggs F (1995) Transcriptional regulation of phospholamban gene and translational regulation of SERCA2 gene produces coordinate expression of these two sarcoplasmic reticulum proteins during skeletal muscle phenotype switching. *J. Biol. Chem.* 270: 11619-11622.
- Huber B**, Pette D (1996) Dynamics of parvalbumin expression in low-frequency-stimulated fast-twitch rat muscle. *Eur. J. Biochem.* 236: 814-819.
- Hudlická O**, Dodd L, Renkin E, Gray S (1982a) Early changes in fiber profile and capillary density in long-term stimulated muscles. *Am. J. Physiol.* 243: H528-H535.
- Hudlická O**, Tyler K, Srihari T, Heilig A, Pette D (1982b) The effect of different patterns of long-term stimulation on contractile properties and myosin light chains in rabbit fast muscles. *Pflügers Arch.* 393: 164-170.
- Ishii T**, Sunami O, Saitoh N, Nishio H, Tekeuchi T, Hata F (1998) Inhibition of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by nitric oxide. *FEBS Lett.* 440(1-2): 218-222.
- Itoh H**, Ohkuwa T, Yamamoto T, Sato Y, Miyamura M, Maoi M (1998) Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. *Life Sci.* 63(21): 1921-1929.
- Jansson E** (1981) Acid soluble and insoluble glycogen in human skeletal muscles. *Acta Physiol. Scand.* 113: 337-340.
- Jasmin B**, Lavoie P, Gardiner P (1988) Fast axonal transport of labeled proteins in motoneurons of exercise-trained rats. *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* 255: C731-736.
- Jenkins R** (1993) Exercise, oxidative stress and antioxidants: a review. *Int. J. Sport Nutr.* 3: 356-375.
- Jentsch T**, Stein V, Weinreich F, Zdebick A (2002) Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* 82: 503-568.
- Ji L**, Dillon D, Wu E (1990) Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* 258: R918-R923.

- Ji L, Fu R** (1992) Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J. Appl. Physiol.* 72: 549-554.
- Ji L, Fu R, Mitchell E** (1992) Glutathione and antioxidant enzyme in skeletal muscle: effect of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol.* 73(5): 1854-1859.
- Ji L** (1993) Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exer.* 25: 225-231.
- Ji L** (1995) Exercise and oxidative stress: role of the intracellular antioxidant systems. *Exer. Sports Sci. Rev.*, Vol 23, JO Holloszy (Ed.). Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 135-166.
- Ji L, Bejma J, Ramires P, Donahue C** (1998) Free radical generation and oxidative stress in the heart are intensified during aging and exhaustive exercise. *Med. Sci. Sports Exer.* 30(Suppl): 321.
- Jones R** (1981) The influence of electrical activity on the development of newborn innervated rat muscles. *Pflügers Arch.* 391: 68-73.
- Jones D** (1981) Muscle fatigue due to changes beyond the neuromuscular junction. In: R. Porter & J. Whelan (eds). *Human muscle fatigue: Physiological Mechanisms*, pp. 178-196. Ciba Foundation Symposium 82. Medical Press, London.
- Jones D, Bigland-Ritchie B** (1986) Electrical and contractile changes in muscle fatigue. In: B. Saltin (ed). *Biochemistry of Exercise: International series on Sport Sciences*, Vol 16, pp. 377-392. Human Kinetics Publishers, Champaign, IL.
- Jones D, Newham D, Torgan C** (1989) Mechanical influences on long-lasting human muscle fatigue and delayed-onset pain. *J. Physiol.* 412: 415-427.
- Joplin R, Franchi L, Salmons S** (1987) Changes in the size and synthetic activity of nuclear populations in chronically stimulated rabbit skeletal muscle. *J. Anat.* 155: 39-50.
- Kabbara A, Allen D** (1999) The role of calcium stores in fatigue of isolated single muscle fibres from the cane toad. *J. Physiol. (Lond)* 519: 169-176.
- Kang C, Lavoie P, Gardiner P** (1995) Chronic exercise increases SNAP-25 abundance in fast-transported proteins of rat motoneurons. *NeuroReport* 6: 549-553.
- Kanter M** (1994) Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Int. J. Sport Nutr.* 4: 205-220.
- Kanter M** (1995) Free radical in exercise: effect on antioxidant nutritional supplementation. *Exercise and Sports Sciences Reviews*, Vol. 23. JO Holloszy (Ed.). Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 375-397.
- Katz A, Sahlin K, Henriksson J** (1986) Muscle ATP turnover rate during isometric contraction in humans. *J. Appl. Physiol.* 60: 1839-1842.
- Kent-Braun J, Sharma K, Weiner M** (1993) Central basis of muscle fatigue in chronic fatigue syndrome. *Neurology* 43: 125-131.
- Kentish J** (1986) The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscle from rat ventricle. *J. Physiol.* 370: 585-604.
- Kernell D, Monster A** (1982) Motoneurone properties and motor fatigue. An intracellular study of gastrocnemius motoneurons of the cat. *Exp. Brain Res.* 46: 197-204.
- Key B, Parker A, Giorgi P** (1984) Endurance exercise does not modify nerve fibre morphology in the rat soleus nerve. *Brain Res.* 297: 137-144.
- Khanna S, Atalay M, Laaksonen D, Gul M, Roy S, Sen C** (1999) Alpha-lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise (Abstract). *J. Appl. Physiol.* 86: 1191-1196.

- Klug G**, Leberer E, Leisner E, Simoneau J, Pette D (1988) Relationship between parvalbumin content and the speed of relaxation in chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Pflügers Arch.* 411: 126-131.
- Kraus W**, Torgan C, Taylor D (1994) Skeletal muscle adaptation to chronic low-frequency motor nerve stimulation. *Exer. Sport Sci. Rev.* 22: 313-360.
- Krawitz S**, Fedirchuk B, Dai Y, Jordan L, McCrea D (2001) State-dependent hyperpolarization of voltage threshold enhances motoneurone excitability during fictive locomotion in the cat. *J. Physiol.* 532: 271-278.
- Kretzschmar M**, Müller D (1993) Aging, training and exercise: a review of effects of plasma glutathione and lipid peroxidation. *Sports Med.* 15: 196-209.
- Kugelberg E**, Lindgren B (1979) Transmission and contraction fatigue of rat motor units in relation to succinate dehydrogenase activity of motor units fibres. *J. Physiol. (Lond)* 288: 285-300.
- Lamb P**, Junankar D, Stephenson D (1995) Raised intracellular $[Ca^{2+}]$ abolishes excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of rat and toad. *J. Physiol* 489(Pt2): 349-362.
- Lambert M**, Noakes T (1990) Spontaneous running increases VO_2 max and running performance in rats. *J. Appl. Physiol.* 68: 400-403.
- Lannergren J**, Bruton J, Westerblad H (1999) Vacuole formation in fatigued single muscle fibres from frog and mouse. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 20: 19-32.
- Larsson L**, Edstrom L, Lindergren B, Gorza L, Schiaffino S (1991) MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am. J. Physiol.* 261: C93-C101.
- Laughlin M**, Simpson T, Sexton W, Brown O, Smith J, Korthuis R (1990) Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidants enzymes, and exercise training. *J. Appl. Physiol.* 68: 2337-2343.
- Lawler J**, Powers S, Visser T, Van Dijk H, Korthuis M, Ji L (1993) Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effect of fiber type and age. *Am. J. Physiol.* 265: R1344-R1350.
- Leaf D**, Kleinman M, Hamilton M, Deitrick R (1999) The exercise-induced oxidative stress paradox: the effects of physical exercise training. *Am. J. Med. Sci.* 317(5): 295-300.
- Leberer E**, Pette D (1984) Lactate dehydrogenase isozymes in type I, IIA and IIB fibres of rabbit skeletal muscles. *Histochemistry* 80: 295-298.
- Leberer E**, Pette D (1986) Immunochemical quantitation of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, of calsequestrin and of parvalbumin in rabbit skeletal muscles of defined fiber composition. *Eur. J. Biochem.* 156: 489-496.
- Leberer E**, Härtner K, Pette D (1987) Reversible inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase by altered neuromuscular activity in rabbit fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.* 162: 555-561.
- Leeuw T**, Pette D (1996) Coordinate changes of myosin light and heavy chains isoforms during forced fiber type transitions in rabbit muscle. *Dev. Gen.* 19: 163-168.
- Leeuwenburgh C**, Fiebig R, Ji L (1994) Glutathione regulation during prolonged exercise in glutathione adequate and depleted mice. *Med. Sci. Sports Exer.* 26(Suppl): 133.
- Leeuwenburgh C**, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths Y, Gore M, Ji L (1997) Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am. J. Physiol.* 272: R363-R369.
- Leeuwenburgh C**, Ji L (1998) Glutathione and glutathione ethyl ester supplementation of mice alter glutathione homeostasis during exercise. *J. Nutr.* 128: 2420-2426.

- Lexell J**, Jarvis J, Downham D, Salmons S (1992) Quantitative morphology of stimulation-induced damage in rabbit fast-twitch skeletal muscles. *Cell Tissue Res.* 269:195-204.
- Li J**, Chan K, Xin D, Li H (1998) A study of generation of oxygen free radicals in skeletal muscle during and after exercise. *Med. Sci. Sports Exer.* 30(Suppl): 321.
- Li J**, Tong C, Xu D, Chan K (1999) Changes in membrane fluidity and lipid peroxidation of skeletal muscle mitochondria after exhaust in exercise in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 80(2): 113-117.
- Lomako J**, Lomako W, Whelan W (1991) Proglycogen: a low-molecular-weight form of muscle glycogen. *FEBS Lett.* 279: 223-228.
- Lomako J**, Lomako W, Whelan W, Dombro R, Neary J, Norenberg M (1993) Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen. *FASEB J.* 7: 1386-1393.
- Lowesntein J** (1972) Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol. Rev* 52: 382-414.
- Lowry O**, Passonneau J (1972) A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York, London.
- Ma J**, Zhao J (1994) Highly cooperative and hysteretic response of the skeletal muscle ryanodine receptor to changes in proton concentrations. *Biophys. J.* 67: 626-633.
- Maier A**, Gambke B, Pette D (1986) Degeneration-regeneration as a mechanism contributing to the fast to slow conversion of chronically stimulated fast-twitch rabbit muscle. *Cell Tissue Res.* 244: 635-643.
- Maier A**, Gorza L, Schiaffino S, Pette D (1988) A combined histochemical and immunohistochemical study on the dynamics of fast-to-slow fiber transformation in chronically stimulated rabbit muscle. *Cell Tissue Res.* 254: 59-68.
- Marin E**, Hanninen O, Müller D, Klinger W (1990) Influence of acute physical exercise on glutathione and lipid peroxide in blood of rat and man. *Acta Physiol. Hung.* 76: 71-76.
- Martin T**, Bodine-Fowler S, Roy R, Eldred E, Edgerton V (1988) Metabolic and fiber size properties of cat tibialis anterior motor units. *Am. J. Physiol.* 255: C43-C50.
- Matsunaga S**, Harmon S, Gohlsch B, Ohlendieck K, Pette D (2001) Inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in low-frequency stimulated rat muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22: 685-691.
- Matsushita S**, Dux L, Pette D (1991) Distribution of active and inactive (nonphosphorylating) sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase molecules in low-frequency stimulated rabbit fast-twitch muscle. *FEBS Lett.* 294: 203-206.
- Matsushita S**, Pette D (1992) Inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in low-frequency stimulated muscle results from a modification of the active site. *Biochem. J.* 285(Pt1): 303-309.
- Mayne C**, Jarvis J, Salmons S (1991) Dissociation between metabolite levels and force fatigue in the early stages of stimulation-induced transformation of mammalian skeletal muscle. *Basic Appl. Myol.* 1: 63-70.
- McComas A**, Galea V, Einhorn R, Hicks A, Kuiack S (1993) The role of the Na^+ - K^+ -pump in delaying muscle fatigue. In: AJ Sargeant & D Kernell (Eds). *Neuromuscular fatigue*, pp. 35-43. North Holland, Amsterdam.
- McCord J**, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- McCully K**, Authier B, Olive J, Clark B (2002) Muscle fatigue: The role of metabolism. *Can. J. Appl. Physiol.* 27(1): 70-82.
- Meissner G**, Lu X (1995) Dihydropyridine receptor-ryanodine receptor interactions in skeletal muscle excitation-contraction

coupling. *Biosci. Rep.* 15:399-408.

Meydani M, Evans W (1993) Free radicals, exercise, and aging. *Free radical in aging*. Yu BP. (Ed). Boca Raton, CRS Press, pp. 183-204.

Miller R, Giannini D, Milner-Brown H, Layzer R, Koretsky A, Hooper D, Wiener M (1987) Effects of fatiguing exercise on high-energy phosphates, force, and EMG: evidence for three phases of recovery. *Muscle & Nerve* 10: 810-821.

Misra H, Fridovich I (1972) The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 247: 6960-6964.

Monti R, Roy R, Edgerton V (2001) Role of motor unit structure in defining function. *Muscle & Nerve* 24: 848-866.

Morell P, Norton W (1978) Myelin. *Sci. Amer.* 238: 74-89.

Morgan D (1990) New insights into the behaviour of muscle during active lengthening. *Biophys. J.* 57: 209-221.

Munson J, Foehring R, Lofton S, Zengel J, Sypert G (1986) Plasticity of medial gastrocnemius motor units following cordotomy in the cat. *J. Neurophysiol.* 55: 619-634.

Munson J, Foehring R, Mendell L, Gordon T (1997) Fast-to-slow conversion following chronic low-frequency activation of medial gastrocnemius muscle in cats.2. Motoneuron properties. *J. Neurophysiol.* 77: 2605-2615.

Murphy M, Packer M, Scarlett J, Martin S (1998) Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen. Pharmacol.* 31: 179-186.

Myburgh K, Cooke R (1997) Response of compressed skinned muscle fibers to conditions that simulate fatigue. *J. Appl. Physiol.* 82: 1297-1304.

Myburgh K (2004) Protecting muscle ATP: positive roles for peripheral defense mechanism- Introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36, 16-19.

Navarro-Arévalo A, Sánchez del Pino M (1998) Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. *Mech. Ageing Dev.* 104:91-102.

Neeper S, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman C (1995) Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 373: 109.

Nemeth P, Pette D, Vrbová G (1981) Comparison of enzyme activities among single muscle fibres within defined motor units. *J. Physiol.* 311: 489-495.

Nemeth P, Solanki L, Bordon D, Hamm T, Reinking R, Stuart D (1986) Uniformity of metabolic enzymes within individual motor units. *J. Neurosci.* 6: 892-898.

Newham D, Mills K, Quigley B, Edwards R (1983) Pain and fatigue after concentric and eccentric muscle contractions. *Clin. Sci.* 64: 55-62.

Nimmo M, Snow D (1982) Time course of ultrastructural changes in skeletal muscle after two types of exercise. *J. Appl. Physiol.* 52: 910-913.

Nosek T, Fender J, Godt R (1987) It is diprotonated inorganic phosphate that depresses force in skinned skeletal muscle fibres. *Science* 236: 191-193.

Oba T, Koshita M, Yamaguchi M (1996) H₂O₂ modulates twitch tension and increases P_o of Ca²⁺ release channel in frog skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 40: C810-C818.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.

Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M (1997) Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised

rats. *Acta Physiol. Scand.* 159: 237-244.

Ohlendieck K, Briggs F, Lee K, Wechsler A, Campbell K (1991) Analysis of excitation-contraction-coupling components in chronically stimulated canine skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 202: 739-747.

Ortenblad N, Madsen K, Djurhuus M (1997) Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am. J. Physiol.* 272: R1258-R1263.

Packer L (1986) Oxygen radicals and antioxidants in endurance training. *Biochemical aspects of physical exercise*. G Benzi, L Packer, N Siliprandi (Eds.). New York: Elsevier Science Publishers, pp. 73-92.

Packer L, Almada A, Rothfuss L, Wilson D (1989) Modulation of tissue vitamin E levels by physical exercise. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 570: 311-321.

Parra J, Pette D (1995) Effects of low-frequency stimulation on soluble and structure-bound activities of hexokinase and phosphofructokinase in rat fast-twitch muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1251: 154-160.

Pate E, Bhimani M, Franks-Skiba K, Cooke R (1995) Reduced effect of pH on skinned rabbit psoas muscle mechanics at high temperatures: implications for fatigue. *J. Physiol.* 486: 689-694.

Pette D, Ramírez B, Müller W, Simon R, Exner G, Hildebrand R (1975) Influence of intermittent long-term stimulation on contractile, histochemical and metabolic properties of fibre populations in fast and slow rabbit muscles. *Pflügers Arch.* 361: 1-7.

Pette D, Müller W, Leisner E, Vrbová G (1976) Time dependent effects on contractile properties, fibre population, myosin light chains and enzymes of energy metabolism in intermittently and continuously stimulated fast twitch muscles of the rabbit. *Pflügers Arch.* 364: 103-112.

Pette D, Heilmann C (1979) Some characteristics of sarcoplasmic reticulum in fast-and slow-twitch muscles. *Biochem. Soc. Trans.* 7: 765.

Pette D, Vrbová G (1985) Invited review: neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle & Nerve* 8: 676-689.

Pette D, Staron R (1990) Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 116: 1-76.

Pette D, Vrbová G (1992) Adaptation of mammalian skeletal muscle to chronic electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 120: 115-202.

Pette D, Schnez U (1997) Coexistence of fast and slow type myosin light chains in single muscle fibres during transformation as induced by long term stimulation. *FEBS Lett.* 83: 128-130.

Peuker H, Pette D (1995) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction detects induction of cardiac-like a myosin heavy chain mRNA in low frequency stimulated rabbit fast-twitch muscle. *FEBS Lett.* 367: 132-136.

Powers S, Criswell D, Lawler J, Ji L, Martin D, Herb R, Dudley G (1994) Influence of exercise intensity and fiber type on antioxidant enzyme activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266: R375-R380.

Powers S, Ji L, Leeuwenburgh C (1999) Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exer.* 31: 987-997.

Prats, C (2003) Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, Unidad de Bioquímica.

Rafuse V (1993) Regulation of motor unit size after nerve injuries. Ph.D. Thesis, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

- Reddy V**, Kumar C, Prasad M, Reddanna P (1992) Exercised-induced oxidant stress in the lung tissue: role of dietary supplementation of vitamin E and selenium. *Biochem. Int.* 26: 863-871.
- Reichmann H**, Hoppeler H, Mathieu-Costello O, Von Bergen F, Pette D (1985) Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits. *Pflügers Arch.* 404: 1-9.
- Rodrigo G**, Standen N (2005) ATP-sensitive potassium channels. *Curr Pharm. Des.* 11: 1915-40.
- Romero M**, Osuna C, García-Perganeda A, Carrillo-Vico A, Guerrero J (1999) The pineal secretory product melatonin reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in U-937 cells. *J. Pineal. Res.* 26: 227-235.
- Rubinstein N**, Mabuchi K, Pepe F, Salmons S, Gergely J, Sréter F (1978) Use of type-specific antimyosins to demonstrate the transformation of individual fibers in chronically stimulated rabbit fast muscles. *J. Cell Biol.* 79: 252-261.
- Sacco P**, McIntyre D, Jones D (1994) Effects of length and stimulation frequency on fatigue of the human anterior tibialis muscle. *J. Appl. Physiol.* 77: 1148-1154.
- Saito A**, Seiler S, Chu A, Fleischer S (1984) Preparation and morphology of sarcoplasmic reticulum terminal cisternae from rabbit skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 99: 875-885.
- Salmons S** (1990) On the reversibility of stimulation-induced muscle transformation. D.Pette (Ed). *The Dynamic State of Muscle Fibers*. Berlin, New York: Walter de Gruyter, pp. 401-414.
- Salmons S**, Jarvis J (1991) Simple optical switch for implantable devices. *Med. Biol. Eng. Comput.* 29: 554-556.
- Salo D**, Donovan C, Davies K (1991) HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radical. Biol. Med.* 11: 239-246.
- Saltin B**, Gollnick P (1983) Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. L. D. Peachey, R. H. Adrian and S. R. Geiger (Eds). *Handbook of Physiology: Skeletal Muscle*. Bethesda, MD: American Physiological Society, pp. 555-632.
- Sammeck R**, Gibb W, Deville V (1981) Modulation of axo-glia interrelationship by swimming. *Trans. Amer. Soc. Neurochem.* 12: 259.
- Saxod R**, Bouvert J (1981) Growth and myelination in peripheral nerves of hypothyroid chick. *Acta Anat.* 111: 132.
- Saxton J**, Donnelly A (1994) Characteristics of impaired voluntary torque generating capacity after maximum voluntary eccentric muscular work in man. *J. Physiol.* 477: 57-58.
- Scales D**, Inesi G (1976) Assembly of ATPase protein in sarcoplasmic reticulum membranes. *Biophys. J.* 16: 735.
- Schuler M**, Pette D (1996) Fiber transformation and replacement in low-frequency stimulated rabbit fast-twitch muscles. *Cell Tissue Res.* 285: 297-303.
- Seburn K**, Gardiner P (1995) Adaptations of rat lateral gastrocnemius motor units in response to voluntary running. *J. Appl. Physiol.* 78: 1673-1678.
- Sejersted O**, Sjogaard G (2000) Dynamics and consequences of potassium shift in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev.* 80: 1411-1481.
- Sen C**, Marin E, Kretzschmar M, Hanninen O (1992) Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J. Appl. Physiol.* 73: 1265-1272.
- Sen C**, Atalay M, Hanninen O (1994) Exercised-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *J. Appl. Physiol.* 77: 2177-2187.
- Sen C** (1995) Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* 79: 675-686.

- Shalin K** (1978) Intracellular pH and energy metabolism in skeletal muscle of man. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 455: 1-56.
- Sharma A**, Bajada S, Thomas P (1981) Influence of streptozotocin-induced diabetes on myelinated nerve fibre maturation and body growth in the rat. *Acta Neuropath.* 53: 257-265.
- Sickles D**, McLendon R (1983) Metabolic variation among rat lumbosacral alfa-motoneurons. *Histochemistry* 79: 205-217.
- Sickles D**, Oblak T (1984) Metabolic variation among alfa-motoneurons innervating different muscle-fiber types. I. Oxidative enzyme activity. *J. Neurophysiol.* 51(3): 529-537.
- Simoneau J**, Pette D (1988) Species-specific effects of chronic nerve stimulation upon tibialis anterior muscle in mouse, rat, guinea pig, and rabbit. *Pflügers Arch.* 412: 86-92.
- Simoneau J**, Kaufmann M, Härtner K, Pette D (1989) Relations between chronic stimulation-induced changes in contractile properties and the Ca^{2+} -sequestering system of rat and rabbit fast-twitch muscles. *Pflügers Arch.* 414: 629-633.
- Simoneau J**, Kaufmann M, Pette D (1993) Asynchronous increases in oxidative capacity and resistance to fatigue of electrostimulated muscles of rat and rabbit. *J. Physiol. (Lond)* 460: 573-580.
- Smith J**, Grisham M, Granger D, Korthus R (1989) Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic muscle. *Am. J. Physiol.* 256: H789-H793.
- Somani S** (1996) Exercise, drugs, and tissue specific antioxidant system. In: *Pharmacology in exercise and sports*. Somani SM (Ed). Boca Ratón, FL, pp. 57-96.
- Spencer M**, Yan Z, Katz A (1991) Carbohydrate supplementation attenuates IMP accumulation in human during prolonged exercise. *Am. J. Physiol.: Cell.* 30: C71-C76.
- Spielmann J**, Laouris Y, Nordstrom M, Robinson G, Reinking R, Stuart D (1993) Adaptation of cat motoneurons to sustained and intermittent extracellular activation. *J. Physiol.* 464: 75-120.
- Spriet L**, Soderlund K, Bergstrom M, Hultman E (1987) Skeletal muscle glycogenolysis, glycolysis, and pH during electrical stimulation in men. *J. Appl. Physiol.* 62: 616-621.
- Stalberg E** (1980) Macro EMG, a new recording technique. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 43: 475-482.
- Stalberg E**, Antoni L (1980) Electrophysiological cross section of the motor unit. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 43: 469-474.
- Stalberg E**, Dioszeghy P (1991) Scanning EMG in normal muscle and in neuromuscular disorders. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 81: 403-416.
- Suzuki H**, Tsuzimoto H, Ishiko T, Kasuga N, Taguchi S, Ishihara A (1991) Effect of endurance training on the oxidative enzyme activity of soleus motoneurons in rats. *Acta Physiol. Scand.* 143: 127-128.
- Sweeney H**, Kushmerick M, Mabuchi K, Gergely J, Sréter F (1986) Velocity of shortening and myosin isozymes in two types of rabbit fast-twitch muscle fibers. *Am. J. Physiol.* 251: C431-C434.
- Takahashi M**, Hood D (1993) Chronic stimulation-induced changes in mitochondria and performance in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 74: 934-941.
- Taylor S**, Rüdél R (1970) Striated muscle fibres: inactivation of contraction induced by shortening. *Science* 167: 882-884.
- Tiidus P**, Houston M (1993) Vitamin E does not affect the responses to exercise training and acute exercise in female rats. *J. Nutr.* 123: 834-840.
- Tomanek R**, Tipton C (1967) Influence of exercise and tenectomy on the morphology of a muscle nerve. *Anat. Rec.* 159: 105-114.

- Tomanek R** (1976) Ultrastructure differentiation of skeletal muscle fibres and their diversity. *J. Ultrastruct. Res.* 55: 212.
- Totosy de Zepetnek J**, Zung H, Erdebil S, Gordon T (1992a) Innervation ratio is an important determinant of force in normal and reinnervated rat tibialis anterior muscle. *J. Neurophysiol.* 67: 1385-1403.
- Totosy de Zepetnek J**, Zung H, Erdebil S, Gordon T (1992b) Motor unit categorization based on contractile and histochemical properties: a glycogen depletion analysis of normal and reinnervated rat tibialis anterior muscle. *J. Neurophysiol.* 67: 1404-1415.
- Uzman B**, Hedley-White E (1968) Myelin:dynamic or stable. *J. Gen. Physiol.* 51: S8.
- Van Winkle W**, Schwartz A (1978) Morphological and biochemical correlates of skeletal muscle contractility in the cat. I. Histochemical and electron microscopic studies. *J. Cell Physiol.* 97: 99.
- Venditti P**, Di Meo S (1997) Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int. J. Sports Med.* 18: 497-502.
- Venditti P**, Masullo P, Di Meo S (1999) Effect of exercise duration on characteristics of mitochondrial population from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 368(1): 112-120.
- Visoli F** (1997) Evaluation of AOC by chemiluminiscence. *Analytical Biochem.* 249: 244-246.
- Walmsley B**, Hodgson J, Burke R (1978) Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles in freely moving cats. *J. Neurophysiol.* 41: 1203-1216.
- Weltan S**, Bosch A, Dennis S, Noakes T (1998) Influence of muscle glycogen content on metabolic regulation. *Am. J. Physiol.: Endocrin. and Met.* 37: E72-E82.
- Westerblad H**, Lee J, Lamb A, Bolsover S, Allen D (1990) Apatial gradients of intracellular calcium in skeletal muscle during fatigue. *Pflügers Archiv.* 415: 734-740.
- Westerblad H**, Duty S, Allen D (1993) Intracellular calcium concentration during low-frequency fatigue in isolated single fibres of mouse skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 75: 382-388.
- Westerblad H**, Allen D, Bruton J, Andrade F, Lannergren J (1998) Mechanism underlying the reduction of isometric force in skeletal muscle fatigue. *Acta Physiol. Scand.* 162: 253-260.
- Westerblad H**, Bruton J, Allen D, Lannergren J (2000) Functional significance of Ca²⁺ in long-lasting fatigue of skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 83: 166-174.
- Wiechers D** (1990) Single fiber EMG evaluation in denervation and reinnervation. *J. Dent. Res.* 13: 829-832.
- Wilson J**, McCully K, Mancin D, Boden B, Chance B (1988) Relationship of muscle fatigue to pH in man: a 31-phosphorus nuclear magnetic resonance study. *J. Appl. Physiol.* 64: 2333-2339.
- Wood S**, Morgan D, Proske U (1993) Effects of repeated eccentric contractions on structure and mechanical properties of toad sartorius muscle. *Am. J. Physiol.* 265: C792-C800.
- Zengel J**, Reid S, Sybert G, Munson J (1985) Membrane electrical properties and prediction of motor-unit type of medial gastrocnemius motoneurons in the cat. *J. Neurophysiol.* 53(5): 1323-1344.
- Zhang Y**, Marcillat O, Giulvi C, Pryor W (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.* 265: 1665-1675.