



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

“Propiedades mecánicas del músculo esquelético en presencia de un agente inotrópico terapéutico y en un modelo de distrofia muscular en murinos”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:

Joel Medina Monares

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Alicia Ortega Aguilar.

MIEMBRO DE COMITÉ TUTORAL: Dr. Carlos Villarreal Luján.

MIEMBRO DE COMITÉ TUTORAL: Dr. Amir Darío Maldonado Arce.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres

"Antes de dar al pueblo sacerdotes, soldados y maestros, sería oportuno saber si por ventura no se está muriendo de hambre."

León Tolstói

Agradecimientos

A la Dra. Alicia Ortega Aguilar por la paciencia, motivación y disposición que mostró a lo largo de la elaboración de este trabajo.

A la QFB. Rocío Álvarez Medina por su colaboración, consejos y apoyo.

A la Dra. Alhondra Solares Pérez del Laboratorio del Dr. Ramón Coral en el Departamento de Genética del Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE, con quien he colaborado y proporcionó los ratones disgénicos, para los estudios mecánicos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo a través de la beca (#233198) y por su apoyo a través del donativo (CONACYT-24792) otorgado a la Dra. A. Ortega para la realización del proyecto.

A la Dirección General del Personal Académico a través del Programa de Apoyo a la Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA- IN227809) a (AO) de la UNAM por su apoyo durante el periodo de terminación de mi trabajo de tesis.

A los miembros de mi comité tutor: Dra. Alicia Ortega, Dr. Carlos Villarreal y Dr. Amir Darío Maldonado.

A los miembros de mi comité sinodal: Dra. Alicia Ortega, Dr. José Álvarez, Dr. Miguel Ángel Ávila, Dr. Carlos Villarreal y M. en C. Xóchitl López.

Al Dr. David García, por permitirme el uso de las instalaciones del del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina.

Al Bioterio de la Facultad de Medicina que por medio del proyecto S/N 602-02 proporcionó los ratones para el desarrollo de este trabajo.

Quiero agradecer a mis padres por el apoyo brindado a lo largo de mi vida. ¡Los quiero!

A mis hermanos: Margarita y Pedro.

A Manuel Sombra.

A Jesús Eduardo Leyva.

A mis compañeros y amigos de la maestría en física médica de mi generación: Gabi, Xóchitl, Jaime, Alfredo, Dantier, Erandeni y Luis.

A mis compañeros y amigos de la maestría en física médica: Ortiz, Víctor, Karla, Liz, Frida, Paola, Amílcar, Beto, Everardo y de manera especial a Adriana.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 1 del departamento de Bioquímica: Aura, Ricardo, Paco, Aldo, Luis y Jesús.

A la familia Hernández Torres.

A Librado y Lulú.

A Manuel y Chayito.

A Marcelino, Adív y Hermes.

A Antonio y Pilar.

A Rafa, René y Javier.

Al Dr. Enrique Álvarez.

Al Dr. José María Farías.

A Fátima, Paco Alarcón, Báez, Huziel, A. Ortiz, Cachondo, Brisa, Marina, Carolina y Alberto.

Índice general

1. Introducción	7
1.1. Estructura de la fibra muscular	7
1.1.1. Sarcolema	7
1.1.2. Miofibrillas (filamentos de <i>actina</i> y <i>miosina</i>) proteínas con arreglo longitudinal	8
1.1.3. Sarcoplasma	9
1.1.4. Retículo sarcoplásmico	9
1.1.5. Proteínas costaméricas (transversales)	10
1.1.6. Conformación del complejo Distrofina-Proteínas asociadas a la Distrofina (<i>PAD</i>)	11
1.2. Metabolismo muscular	13
1.2.1. Fuentes de energía para la contracción muscular	15
1.3. Elementos del tejido conjuntivo	16
1.3.1. Fibras del tejido conjuntivo.	16
1.4. Biomecánica de la contracción	17
1.5. <i>Simendan</i>	18
1.5.1. Propiedades fisico-químicas	18
1.5.2. Farmacocinética	19
1.5.3. Mecanismos de acción	19
1.6. Distrofias musculares	22
1.6.1. Síntomas	23
1.6.2. Epidemiología	24

1.6.3. Diagnóstico	25
1.6.4. Tratamiento	26
1.7. Distrofia muscular de <i>Erb</i>	26
1.7.1. Clasificación	26
2. Planteamiento del problema	29
2.1. Objetivo	30
2.2. Hipótesis	30
3. Materiales y métodos	31
3.1. Animales	31
3.1.1. Ratones	31
3.2. Fármacos y soluciones	32
3.2.1. Solución de Krebs	32
3.2.2. Simendan	32
3.3. Aislamiento de los músculos	33
3.4. Procedimiento experimental.	34
3.4.1. Protocolo de estimulación.	36
4. Resultados	38
4.1. Efecto de la carencia del δ -sarcoglicano en las propiedades mecánicas del músculo esquelético rápido EDL	38
4.1.1. Sacudida Simple	38
4.1.2. Estimulación Tetánica	40
4.1.3. Coeficiente de desvanecimiento	41
4.1.4. Fatiga	43
4.1.5. Recuperación después de la fatiga.	44
4.2. Efecto de la carencia de δ – <i>sarcoglicano</i> sobre las características mecánicas del músculo esquelético lento (<i>Sóleo</i>)	45
4.2.1. Sacudida simple	45
4.2.2. Estimulación Tetánica	46

4.2.3.	Coefficiente de desvanecimiento para el Sóleo	48
4.2.4.	Fatiga	49
4.2.5.	Recuperación después de la fatiga	50
4.3.	Efectos del <i>L – Simendan</i> en las propiedades mecánicas del músculo rápido extensor <i>digitorum longus – (EDL)</i>	51
4.3.1.	Efectos sobre la sacudida simple	51
4.3.2.	Efectos sobre la fatiga	52
4.3.3.	Coefficiente de desvanecimiento (Fade)	53
5.	Discusión	57
5.1.	Propiedades mecánicas del músculo esquelético en presencia de un agente in- otrópico terapéutico <i>L – Simendan</i>	57
5.1.1.	Efecto del <i>L – Simendan</i> sobre la sacudida simple (<i>SS</i>) del <i>EDL</i>	58
5.1.2.	Efecto del <i>L – Simendan</i> sobre la fatiga del <i>EDL</i>	58
5.1.3.	Efecto del <i>L – Simendan</i> sobre el coeficiente de desvanecimiento en la estimulación tetánica a los largo del protocolo de fatiga del <i>EDL</i>	59
5.1.4.	Propiedades mecánicas del músculo esquelético en un modelo de distrofia muscular en murinos, distrofia muscular de <i>Erb</i>	59
5.1.5.	Sacudida simple (<i>SS</i>) del <i>EDL</i> y <i>Sóleo</i> en la <i>DM</i> de <i>Erb</i>	60
5.1.6.	Tétanos en el <i>EDL</i> y <i>Sóleo</i> en la <i>DM</i> de <i>Erb</i>	60
5.1.7.	Fatiga y Recuperación del <i>EDL</i> y <i>Sóleo</i> en la <i>DM</i> de <i>Erb</i>	61
6.	Conclusiones	62
6.1.	Distrofia de <i>Erb</i>	62
6.2.	L-Simendan	63

Índice de figuras

1-1. Estriaciones en una fibra muscular esquelética.	9
1-2. Retículo sarcoplásmico.	10
1-3. Proteínas costaméricas.	10
1-4. Componentes del Eje <i>Distrofina – Distroglucano – Laminina</i>	11
1-5. Conformación del complejo <i>distrofina – PAD</i>	13
1-6. Mecanismo de “cremallera” de la contracción muscular.	14
1-7. Sistemas metabólicos musculares.	15
1-8. Estructura molecular del <i>simendan</i>	18
1-9. Diagrama del mecanismo de acción del <i>simendan</i> como agente inotrópico.	20
1-10. Modelo del efecto del <i>simendan</i> sobre la contractilidad del músculo estriado.	20
3-1. Ratones.	31
3-2. Localización del <i>EDL</i> y <i>Soleo</i> en humano y en el ratón.	33
3-3. Microscopio, instrumental quirúrgico.	34
3-4. Nudos hechos en los tendones	35
3-5. Músculo aislado y sujetado en la cámara de estimulación.	35
3-6. Estimulador; Osciloscopio; transductor y fuente de poder y amplificador.	35
3-7. Esquema del arreglo experimental	36
4-1. Sacudida simple del músculo rápido <i>Extensor digitorum longus (EDL)</i>	39
4-2. Estimulación Tetánica en el músculo <i>EDL</i>	40
4-3. Cociente de desvanecimiento	42

4-4. Registros representativos del desarrollo de fatiga por estimulación tetánica de alta frecuencia.	43
4-5. Registros representativos de la recuperación de la fatiga.	44
4-6. Sacudida simple del músculo lento <i>Sóleo</i>	45
4-7. Estimulación Tetánica en el músculo <i>Sóleo</i>	47
4-8. Cociente de desvanecimiento en las tres estimulaciones tetánicas consecutivas de la figura 4-8	48
4-9. Registros Representativos del desarrollo de fatiga por estimulación tetánica de alta frecuencia.	49
4-10. Recuperación del músculo <i>Sóleo</i>	50
4-11. Sacudida Simple del <i>EDL</i> con 0, 30, 60 y 90 μM de <i>L - Simendan</i>	51
4-12. Contracción del músculo (<i>EDL</i>) a diferentes concentraciones de <i>L - Simendan</i>	52
4-13. Fatiga de músculos controles.	53
4-14. Fatiga control y a diferentes concentraciones.	53
4-15. Coeficiente de desvanecimiento control.	54
4-16. Comportamiento del coeficiente de desvanecimiento control y a diferentes dosis de <i>L - Simendan</i>	55
4-17. Tétano número 5 del protocolo de fatiga, control y a diferentes concentraciones de <i>L - Simendan</i>	56

Resumen

En este trabajo se presenta un análisis mecánico de la fuerza de contracción del músculo esquelético aislado en un montaje experimental de contracción isotónica. Los parámetros sometidos a evaluación son la variabilidad de la fuerza de contracción del músculo a partir de dos situaciones que hipotéticamente la alterarían, uno es la incorporación de un agente inotrópico terapéutico positivo, que añade una sensibilidad aumentada de la *troponinaC* hacia el *calcio* en el filamento de *actina*, provocando una mayor fuerza de contracción y el otro en un modelo distrófico, donde no se encuentra presente una proteína estructural (δ - *Sarcoglicano*) en el eje transversal de transmisión de fuerza hacia la matriz extracelular, situación patológica que supone una disminución de la fuerza de contracción del músculo. En los experimentos con el *L - simendan* (agente inotrópico) se usaron músculos Extensor Digitorum Longus (*EDL*) de metabolismo glucolítico y para el caso distrófico se usaron tanto músculos *EDL* como *Sóleo*, siendo este último de metabolismo oxidativo. Los resultados obtenidos a lo largo del protocolo de estimulación muestran, en el caso del agente inotrópico, no un aumento sino una disminución de la fuerza de contracción debido a que el fármaco actúa de manera sistémica sobre todas las proteínas calcio-dependientes con las que entra en contacto en la estructura de la célula muscular. En el caso distrófico, donde se presenta una condición anormal del funcionamiento fisiológico, se obtiene un aumento en la fuerza de contracción en los músculos distróficos en comparación con los músculos controles. Adicionalmente se encontró que los músculos distróficos no presentan recuperación en el protocolo de fatiga lo que indica muerte celular.

Capítulo 1

Introducción

Las células del músculo esquelético consisten en fibras alargadas (hasta 35 cm de longitud en el ser humano) y presentan forma cilíndrica con un diámetro que varía entre 10 a 100 μm [1] La función de estas células es transformar la energía química en energía mecánica siendo, de esta manera, las responsables de la actividad motora y de la postura del organismo. En la mayor parte del músculo esquelético, las fibras se extienden en la totalidad de la longitud del músculo excepto por el 2% de ellas. Generalmente se encuentran inervadas por una sola terminación nerviosa ubicada usualmente en la parte media de la fibra. Las fibras o células musculares están compuestas a su vez por miofibrillas o miofilamentos que son arreglos longitudinales de cúmulos de *actina* fibrilar y *miosina* paralelos a la fibra con intersecciones parciales entre ellas. La fibra muscular está cubierta por una membrana (sarcolema) que tiene características propias de las células excitables. Las fibras musculares se agrupan entre sí para dar origen a una organización conocida como fascículo. Cada fascículo contiene numerosas fibras y está sujeto a otro fascículo mediante tejido conectivo y proteínas de anclaje[2][3].

1.1. Estructura de la fibra muscular

1.1.1. Sarcolema

El músculo estriado debe su nombre a su estructura microscópica compuesta por un arreglo longitudinal de unidades contráctiles llamadas sarcómeros. A la membrana celular de la fibra muscular se le denomina Sarcolema. El sarcolema está conformado por una bicapa lipídica no

homogénea que contiene proteínas transmembranales y otras asociadas en la parte interna a la membrana. El Sarcolema está compuesto en su mayor parte por fosfolípidos, elementos con propiedad hidrofílica en su parte fosfatada (polar) e hidrofóbica en sus cadenas de ácidos grasos, que son apolares. En el sarcolema una fracción importante de lípidos son glicoproteínas, lo que forma una cubierta externa de material polisacárido de un espesor muy reducido, que puede estar asociada a la matriz extracelular por medio de interacciones con la colágena, elastina, fibronectina, laminina etc. Esta matriz extracelular forma el cemento de unión lateral entre las fibras. El sarcolema se asocia en la parte terminal de la fibra, con proteínas de colágeno que se agrupan para dar lugar a los tendones, estructuras que mantienen al músculo unido con el sistema óseo.

1.1.2. Miofibrillas (filamentos de *actina* y *miosina*) proteínas con arreglo longitudinal

En las fibras musculares se aprecian con el microscopio óptico los sarcómeros que son componentes estructurales y funcionales de la fibra muscular[4]. Los sarcómeros se originan por la distribución propia de las proteínas (*actina* y *miosina*)(Figura1-1), definiendo bandas y generando líneas que se aprecian como estrías a lo largo de la fibra. La línea más prominente se conocen como línea Z y al espacio comprendido entre líneas Z (del alemán *Zwischen* = *entre*) se le conoce como sarcómero. La morfología de los sarcómeros presenta bandas A (*anisotrópicas*) que se visualizan como bandas anchas y oscuras (estrías ordenadas transversalmente), compuestas principalmente por *miosina* y *actina*. A su vez también presenta bandas I (*isotrópicas*) que son las bandas claras generadas por la distribución de la *f-actina*, la banda clara en el centro de la Banda A se le denomina H (del alemán *Hell* = *Claro*) y contiene exclusivamente a la proteína *miosina*, en la línea M (del alemán *Mitte* = *enmedio*) se encuentran proteínas de anclaje.

En las líneas Z se presenta una gran cantidad de proteínas encargadas de unir al citoesqueleto con el sarcolema como la α - *actina* y la *anquirina*, que mediante la titina une las proteínas que van de la línea Z a la línea M (sarcómero medio). La *titina* es la proteína monomérica más grande conocida (~ 30000 aminoácidos).

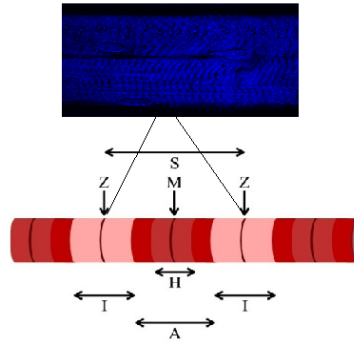


Figura 1-1: Estriaciones en una fibra muscular esquelética y la disposición del sarcómero en la fibra[10].

1.1.3. Sarcoplasma

Las numerosas miofibrillas en cada fibra muscular están yuxtapuestas y suspendidas en el citoplasma (sarcoplasma). Este líquido contiene grandes cantidades de potasio, magnesio y fosfato, así como enzimas del metabolismo. Cuenta también con un gran número de mitocondrias que tienen una disposición subsarcolemal o más central, a lo largo del eje longitudinal de la fibra, necesarias para el aporte energético en músculos con metabolismo oxidativo, como es el caso del los músculos lentos o posturales. Es en el sarcoplasma en donde se acumula la fosfocreatina, molécula de alta energía indispensable para la actividad muscular continua.

1.1.4. Retículo sarcoplásmico

En el sarcoplasma existe un extenso y elaborado sistema de membranas en forma de red (Figura1-2) denominada retículo sarcoplásmico (*RS*). Este organelo es el principal reservorio de *calcio* y tiene una participación fundamental en la contracción y relajación muscular. Aquí es en donde se encuentran las proteínas que inician el proceso de contracción al dejar salir el *calcio* (canales de *calcio*, receptor de *rianodina*) y el proceso de relajación al secuestrar de nuevo el *calcio* liberado por los canales de *calcio*. Este proceso es *ATP* dependiente y lo realiza la enzima *SERCA*, que es una *ATPasa* de *calcio*, conocida como el factor relajante del músculo[5].

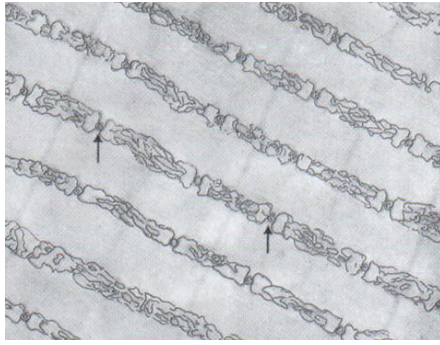


Figura 1-2: Retículo sarcoplásmico que interacciona con los túbulos transversos (flechas).

1.1.5. Proteínas costaméricas (transversales)

Durante la contracción, la *titina* se enrolla en dominios específicos, siguiendo el desplazamiento de la *f-actina* y *miosina*, que involucra un acortamiento en la distancia longitudinal al mismo tiempo que se genera un aumento en el diámetro de la fibra, con un respectivo aumento del volumen[5]; lo que resulta en un incremento de la distancia transversal. Este aumento de volumen incrementa la tensión a través de las proteínas del citoesqueleto a la matriz extracelular a través de las proteínas sub-sarcolemales y trans-sarcolemales. A este conjunto de proteínas involucradas en la transmisión de fuerza radial se les conoce como *Costámeras*(Figura1-3).

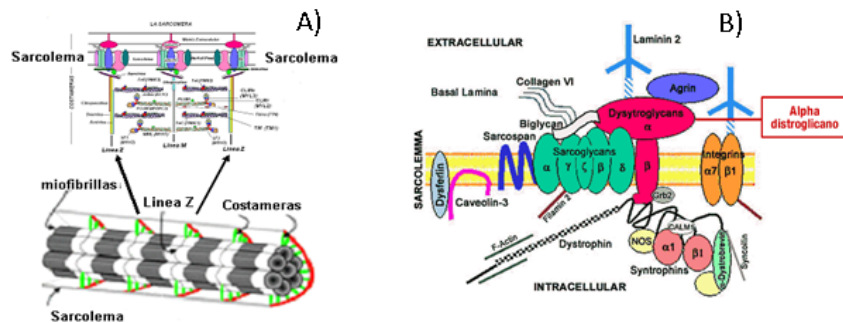


Figura 1-3: A) Disposición de las proteínas costaméricas en el eje transversal de la fibra muscular, B) Proteínas costaméricas relevantes durante la contracción

En la membrana se encuentra el complejo *Sarcoglicano – Distroglicano* que está orientado en la misma dirección que la línea Z y está conformado por proteínas transmembranales, mostrado en el dominio transmembranal de la Figura 1-4. Este complejo se encuentra localizado en el sarcolema y las proteínas que lo conforman se organizan estructuralmente en un grupo de proteínas de membrana, que se encargan de transmitir en forma lateral la energía mecánica de la fibra en la que se encuentran hacia las fibras vecinas por medio de proteínas por las cuales se compone el complejo. Esta función se lleva a cabo mediante interacciones entre proteínas en 3 sub complejos distintos:

- La familia de las distrofinas (proteínas subsarcolemales)
- Los Distroglicanos (α y β)
- El Subcomplejo sarcoglicano (α , β , γ , δ y ξ)–*Sarcospan*[6].

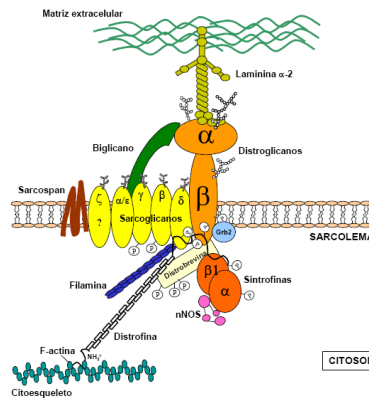


Figura 1-4: Componentes del Eje *Distrofina – Distroglicano – Laminina*.

1.1.6. Conformación del complejo Distrofina-Proteínas asociadas a la Distrofina (*PAD*)

Por lo menos diez tipos de proteínas están ligadas a la distrofina y son conocidas en forma colectiva como Proteínas Asociadas a la Distrofina (*PAD*). Seis de estas *PADs* son glicoproteínas y se denominan Glicoproteínas Asociadas a la Distrofina (*GAD*). Las *GADs* se dividen en dos sub complejos: el distroglicano (*DG*) y el sarcoglicano (*SG*)[8].

El complejo *Distroglicano* se divide en dos sub unidades: $\alpha - DG$ ($74kDa$) y $\beta - DG$ ($156kDa$), se sintetizan de un solo *mRNA* como un polipéptido de $895aa$. El complejo Sarcogli-cano se compone de cuatro diferentes glicoproteínas transmembranales: $\alpha - SG$ ($40,2$ y $50kDa$), $\beta - SG$ ($34,8$ y $43kDa$), $\gamma - SG$ (32 y $35kDa$) y $\delta - SG$ (32 y $35kDa$). Además de Sarcospan, proteína de $25kDa$ que tiene cuatro secuencias intramembranales ocupando alrededor del 60% de la molécula. Adicionalmente dos proteínas intracelulares: $\alpha - distrobrevina$ y *sintrofina* (con isoformas α y β) de las *PAD*.

La conformación del complejo *distrofina - PAD* junto con otras proteínas membranales se puede observar en la Figura 1-5. La distrofina se une a un filamento de $\gamma - actina$ en la región subsarcolemal del citoesqueleto por su dominio de enlace *N-terminal*. Como el dominio intracelular del $\beta - DG$ es pequeño y la longitud del dominio barra se asume que aproximadamente es de $125nm$, el filamento de *actina* debe estar muy cerca de la membrana celular. Entonces la distrofina no está unida a un filamento de $\alpha - actina$ miofibrilar, sino a un filamento de $\gamma - actina$ en la región citoesquelétic subsarcolemal. La región de unión entre el distroglicano y la *distrofina* se encuentra localizado en la terminación distante del dominio de barra o bastón que presenta la *distrofina*, dominios ricos en cisteína. $\beta - DG$ es una proteína transmembranal que extracelularmente se une a $\alpha - DG$ el cual se une a la laminina, uno de los componentes principales de la lamina basal [8].

El complejo *SG* transmembranal se une al complejo *DG* en la membrana celular. Intracelularmente, el sarcospan y la distrobrevina (mediante el *N-terminal*) se unen al complejo *SG*. Los complejos *DG*, *SG* y *sarcospan* se sintetizan en el retículo endoplásmico, donde permanecen como unidades individuales. Después de la traslocación al aparato de Golgi se genera un solo complejo. La distrofina se sintetiza en los poliribosomas y subsecuentemente se une al $\beta - DG$, el cual saca su dominio intracelular del aparato del Golgi al citoplasma. La glicosilación de las sub unidades *DG* y *SG* toma lugar durante el transporte del retículo sarcoplásmico a la membrana celular.

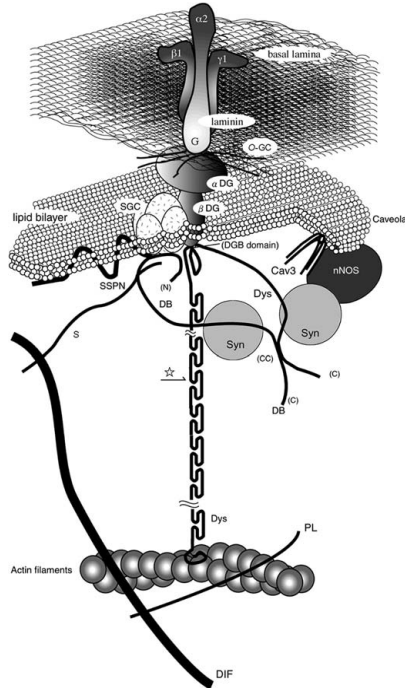


Figura 1-5: Conformación del complejo *distrofina* – *PAD* junto con otras proteínas membranales sobrepuestas.

1.2. Metabolismo muscular

El músculo es el tejido especializado en transformar la energía química en energía mecánica. Cuando el músculo se contrae realiza un trabajo y por lo tanto es necesaria cierta cantidad de energía. Durante el proceso de contracción se escinden grandes cantidades de *ATP* para formar *ADP*. Cuanto mayor sea la cantidad de trabajo que realiza el músculo, mayor será la cantidad de *ATP* que se escinde, fenómeno conocido como efecto Fenn[6], que establece la relación del gasto energético en relación al trabajo realizado por el músculo en los diferentes tipos de contracción. La siguiente serie de eventos es la explicación que se cree como verdadera:

1. Antes de que comience la contracción, las cabezas de los puentes cruzados se unen al *ATP*. La actividad *ATPasa* de la cabeza de *miosina* escinde inmediatamente al *ATP*, aunque deja los productos de la escisión, el *ADP* y el ión fosfato unidos a la cabeza. En este estado la conformación de la cabeza es tal que se extiende perpendicularmente hacia el filamento de *actina*, pero sin unirse a ella todavía.

2. Cuando el complejo *troponina – tropomiosina* se une a los iones de *calcio* quedan al descubierto los puntos activos del filamento de *actina*, y entonces las cabezas de *miosina* se unen a ellos, como se muestra en la Figura 1-6.
3. El enlace entre la cabeza del puente cruzado y el punto activo del filamento de *actina* produce un cambio conformacional en la cabeza, lo que hace que la cabeza se desplace hacia el brazo del puente cruzado. Esto proporciona el golpe activo para tirar del filamento de *actina*.
4. Una vez que se desplaza la cabeza del puente cruzado, se da lugar a la liberación de *ADP* y el ión fosfato que previamente estaban unidos a la cabeza. En el punto de liberación del *ADP* se une una nueva molécula de *ATP*. Esta unión hace que la cabeza se separe de la *actina*.
5. Después de que la cabeza se haya separado de la *actina*, se escinde la nueva molécula de *ATP* para comenzar el ciclo siguiente, generando un nuevo golpe activo. Es decir, la energía una vez más “comprime” la cabeza de nuevo a su posición perpendicular, dispuesta para comenzar el nuevo ciclo de golpe activo.
6. Cuando la cabeza comprimida (con su energía almacenada procedente del *ATP* escindido) se une a un nuevo punto activo del filamento de *actina*, se estira y una vez más proporciona un nuevo golpe activo[6].

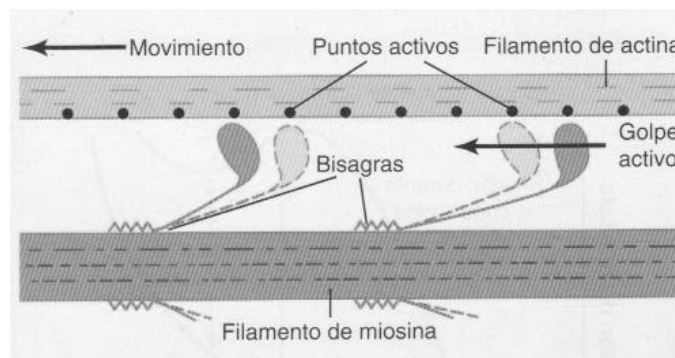


Figura 1-6: Mecanismo de “cremallera” de la contracción muscular.

1.2.1. Fuentes de energía para la contracción muscular

Como se ha revisado anteriormente la contracción muscular depende de la energía que aporta el *ATP*. La mayor parte de esta energía se usa para activar el mecanismo de cremallera con el cual los puentes cruzados tiran de los filamentos de *actina*. Adicionalmente se necesitan pequeñas cantidades para:

1. Bombear iones de *calcio* desde el sarcoplasma hacia el interior del retículo sarcoplásmico después de que se haya finalizado la contracción.
2. Bombear iones de *sodio* y *potasio* a través de la membrana de la fibra muscular para mantener un entorno iónico adecuado para la propagación de los potenciales de acción de la fibra muscular.

La concentración de *ATP* en la fibra muscular es de aproximadamente $4mM$ que suficiente para mantener la contracción completa durante 1 a 2 segundos como máximo. El *ATP* se escinde para formar *ADP*, que transfiere la energía de la molécula de *ATP* al mecanismo contráctil de la fibra muscular. El *ADP* se vuelve a fosforilar en unas fracciones de segundo, lo que le permite al músculo sostener su contracción.

Sistemas metabólicos musculares.

1. Sistema *fosfocreatina – creatina*.
2. Sistema *glucógeno – ácido láctico*.
3. Sistema aeróbico.

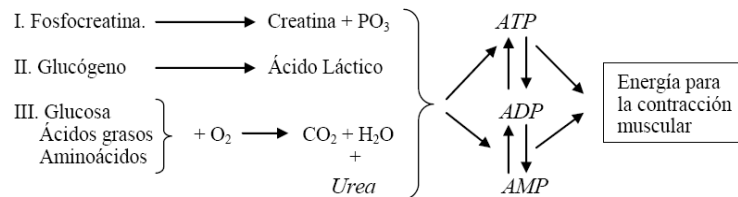


Figura 1-7: Sistemas metabólicos musculares.

1.3. Elementos del tejido conjuntivo

El tejido conjuntivo presenta características básicas/mecánicas ofreciendo soporte estructural, operando como tejido de intercambio permitiendo la nutrición de otros tejidos y órganos, ayudando en la defensa y protección del cuerpo y formando un sitio para depósito de grasa. Está compuesto estructuralmente por una matrix fibrosa y es irrigado por vasos sanguíneos interviniendo de esta manera en el suministro de nutrientes, gases y la extracción de las sustancias de deshecho; además de contener células con funciones de defensa. Dependiendo de la cantidad y tamaño de las fibras de su correspondiente matriz extracelular, el tejido conjuntivo se clasifica en dos tipos:

1. **Tejido conjuntivo laxo.** Presenta una función orientada al metabolismo, está encargado del suministro de sangre y funciones defensivas pero también sus células pueden especializarse en sitios de acumulación de grasa (tejido adiposo blanco) y en la regulación de la temperatura (tejido adiposo pardo)
2. **Tejido conjuntivo denso.** Presentan un soporte resistente para zonas sometidas a tracción como tendones, dermis y ligamentos y también forma encapsulamientos para órganos que necesitan protección por su localización o debilidad estructural. En este tipo de tejido conjuntivo la orientación de las fibras no es aleatoria sino que presenta una distribución que maximiza y distribuye el soporte de la tensión.

En todos los tejidos conjuntivos existen dos componentes esenciales: las células y el material extracelular. Éste último es el responsable de las propiedades físicas de los distintos tejidos conjuntivos y se compone de una sustancia fundamental no fibrilar en el seno de la cual se encuentran distintas fibras. En la matriz extracelular se presenta un tercer componente: las glucoproteínas estructurales que son responsables de la interacción entre las células y los demás constituyentes[7].

1.3.1. Fibras del tejido conjuntivo.

La componente fibrosa del tejido conjuntivo pertenece a dos tipos principales: *colágena* y *elastina*. Las fibras formadas por la *colágena* es la formación fibrilar más abundante en los

tejidos conjuntivos y la proteína más abundante en el cuerpo humano, siendo particularmente la *colágena* tipo I. La función más importante de la *colágena* es soportar tensiones y se encuentra presente en los tejidos conjuntivos de carácter fibroso como tendones, ligamentos, la dermis de la piel y el hueso, y su estructura que varía en relación a la tensión que soporta (de muy laxa a muy densa). Estos tipos de fibras son visibles al microscopio óptico. La *elastina* se organiza en fibras o en láminas discontinuas en la matriz extracelular y le confiere propiedades mecánicas de elasticidad. Son difíciles de observar al microscopio óptico sin recurrir a tinciones.

Tinciones

De las tinciones más usadas para visualizar el tejido conjuntivo son:

- De Van Gieson, el tejido muscular se tiñe de amarillo, los núcleos de todas las células se tiñen de negro parduzco y las fibras de *colágena* se tiñen de color rosa fucsia.
- Azul acilán con *hematoxilina/eosina* tiñe al cartílago de azul, los núcleos de negro azulado y el citoplasma rojizo, el tejido conjuntivo se tiñe poco.

1.4. Biomecánica de la contracción

Los músculos constituyen en el organismo los mecanismos de generación de fuerza y movimiento para los seres vivos[9]. Existe evidencia histológica de los siguientes elementos estructurales presentes en su constitución: elementos contráctiles (*EC*) que son generadores activos de fuerza, elementos elásticos en serie (*EES*) y en paralelo (*EEP*), elementos viscosos (*EV*) y naturalmente elementos inerciales (masa muscular); cada uno de los cuales produce una respuesta fisiología que en conjunto generan fuerza y/o movimiento.

La unidad contráctil funcional en el músculo es el sarcómero, unidad microscópica de $1\mu m$ a $3\mu m$ de longitud, formado por filamentos gruesos, constituidos principalmente de moléculas de la proteína llamada *miosina*, filamentos delgados de otra proteína (fundamentalmente *actina*) y elementos estructurales de tejido conectivo. En el *EC* los llamados puentes cruzados constituyen el mecanismo de generación de fuerza (teoría de los filamentos deslizantes)[11]. La elasticidad natural de los materiales orgánicos, desde proteínas tales como *elastina* y *titina* hasta una

estructura macroscópica como los tendones, permite considerar la presencia de elementos elásticos en cualquier modelo de la contracción muscular. La viscosidad surge del movimiento de las estructuras musculares en matrices de líquidos intra y extracelulares. La presencia de masa en esos componentes da origen a los elementos inerciales[12].

1.5. *Simendan*

1.5.1. Propiedades fisico-químicas

El nombre químico es (*S*)o(*R*) – [[4 – (1,4,5,6 – tetrahidro – 4 – metil – 6 – oxo – 3 – piridazinila)fenil]hidrazono]propanedinitrilo[13] , su peso molecular es 280,29 y su fórmula es $C_{14}H_{12}N_6O$ (Figura1-8). Es un ácido débil y moderadamente lipofílico con un pK_a de 6,2. El *simendan* tiene un átomo de carbón quiral ver (Figura1-8), por lo que tiene actividad óptica, el isómero dextrógiro es conocido como *dextrosimendan* y el isómero levógiro, como *levosimendan*. El *levo* y el *dextrosimendan* son los (*R*) – (–) y (*S*) – (+) enantiómeros del *simendan*. La interacción de los isómeros con la *TnC* es diferente en la ausencia de la *Troponina I* (*TnI*) [14]. Ambos estereoisómeros interactúan con los dominios *C*– y *N* – terminales de la *TnC* aislada; sin embargo, el *simendan* ha mostrado tener un efecto en la afinidad por Ca^{2+} de la *TnC* un orden de magnitud mayor que el isómero dextrógiro[14]. El efecto inotrópico del *simendan* se ha demostrado en diferentes modelos animales y en diferentes tipos de células musculares[15][17][18][19]. El efecto del *simendan* sobre la contractilidad del corazón, se ve aún más potenciada sobre modelos animales con insuficiencia cardiaca[20][21]. El metabolito plasmático que se origina del *simendan*, el *OR* – 1896, también tiene un efecto importante inotrópico[22]. Se adquiere comercialmente como un polvo, que se disuelve en una solución glucosada al 5 % en agua y se administra como una infusión intravenosa.

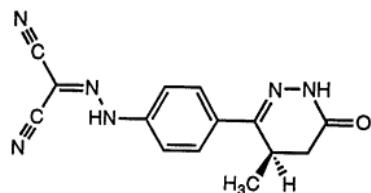


Figura 1-8: Estructura molecular del *simendan*.

1.5.2. Farmacocinética

La molécula tiene una vida media de eliminación de 1 hora, y más del 95% se une a las proteínas plasmáticas. Esta molécula se metaboliza a través de la conjugación con *glutación* en uno de sus grupos *nitrilo*, seguida por una acetilación o ciclización de la molécula. Aunque su administración es intravenosa, se ha encontrado *simendan* y a los productos de su metabolismo en el intestino delgado, el *simendan* es reducido por las bacterias intestinales a un metabolito llamado *amino – fenolpiridazinona* (OR – 1855), el cual se metaboliza por acetilación, dando un compuesto *N – acetilalado* (OR – 1896). Los efectos hemodinámicos del *simendan* y de sus metabolitos son similares, siendo los metabolitos los responsables de prolongar los efectos del *simendan*[23].

1.5.3. Mecanismos de acción

Efecto inotrópico positivo

Se le reconoce un efecto “sensibilizador” al Ca^{2+} . Se ha propuesto que el *simendan* no aumenta la $[Ca^{2+}]_i$, pero aumenta su afinidad por la *TroponinaC* (*TnC*), de manera Ca^{2+} – dependiente. El *simendan* se une al dominio *N – terminal* de la *TroponinaC* y la estabiliza con una propagación subsecuente de su efecto sobre las proteínas contráctiles (Figura 1-9)[24][14][25]. El músculo estriado se contrae cuando el Ca^{2+} se une a la *TnC* y se relaja cuando el Ca^{2+} se libera de los sitios de unión del Ca^{2+} en la *TroponinaC*[16]. Este efecto sobre la afinidad del Ca^{2+} a la *TroponinaC* es muy importante, ya que no debe interferir con las proteínas encargadas de la relajación muscular; como la *SERCA*. Esto significa que la afinidad por *calcio* de la *SERCA* debe permanecer inalterada y conservarse con una mayor afinidad por el Ca^{2+} que la *TnC* con *simendan*.

En la Figura (1-10) A se presenta un esquema de un potencial de acción cardíaco y sus distintas fases (CK_{TO} : canales de K^+ transitorios; $CCa_{tipo L}$: canales de calcio tipo *L*; CK_{ur} , CK_r , y CK_s : canales de *potasio* de activación ultrarrápida, rápida y lenta, respectivamente). Esquema de una interacción túbulo transversal/retículo sarcoplásmico durante el acople excitación-contracción, en donde están involucradas las proteínas del aparato contráctil que contiene a

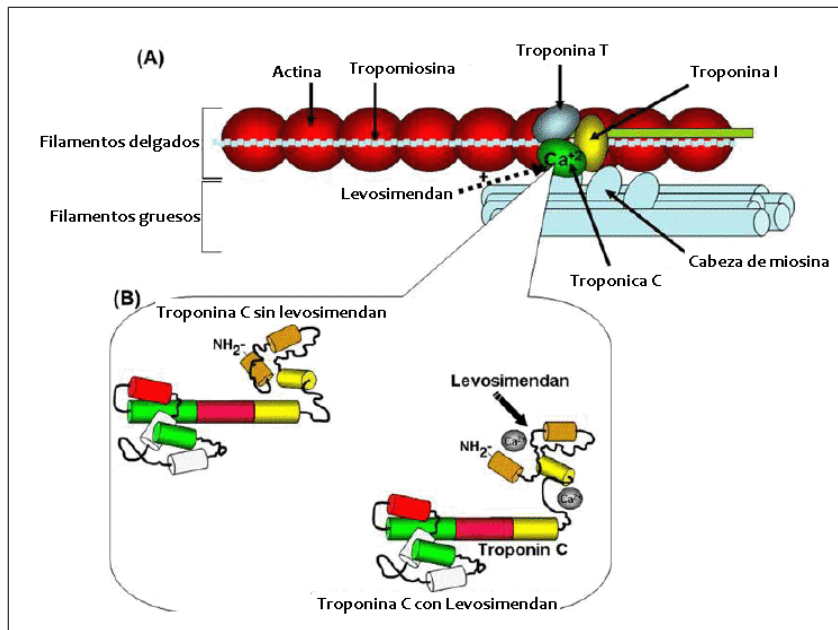


Figura 1-9: Diagrama del mecanismo de acción del *simendan* como agente inotrópico. (A) Unión del *simendan* a la *troponinaC* durante la contracción, aumentando la afinidad al Ca^{2+} de la *TnC*, (B) Sitios de unión del *simendan* en la *TnC*[25].

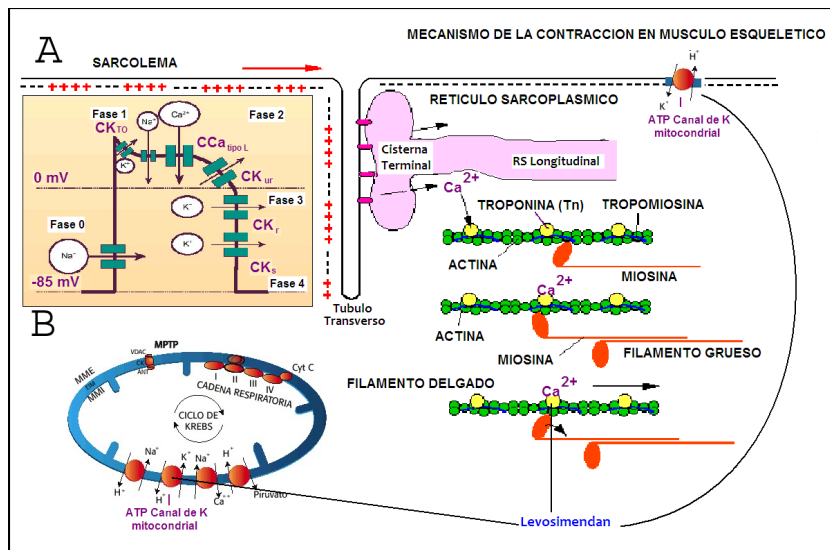


Figura 1-10: A) Modelo del efecto del *simendan* sobre la contractilidad del músculo estriado. B) Esquema del sistema Mitochondrial.

la troponina y (Figura1-10) B que contiene entre otros al canal de K^+ ATP dependiente, al igual que la Sarcolema. Son la *TroponinaC*, y los canales de *potasio ATP* dependientes, las moléculas blanco del *simendan*.

Efecto vasodilatador

El *simendan* tiene un importante efecto vasodilatador tanto en preparaciones de arterias como de venas, probablemente a través de su efecto sobre los canales de K^+ ATP dependientes. La *Glibenclamida*, es un bloqueador de la actividad del canal de K^+ ATP dependiente, inhibe el efecto del *simendan*, lo cual apoya a esta hipótesis del papel del canal de K^+ ATP dependiente sobre la función contráctil del músculo liso vascular [26].

Efecto anti-isquémico

El pre condicionamiento es un fenómeno que experimentan algunos mamíferos y se describe como un periodo corto de isquemia que protege al miocardio de subsecuentes periodos aún más prolongados de isquemia[27]. Se ha propuesto que los canales sarcolemales de K^+ ATP dependientes (*sarcKATP*) en las células musculares vasculares son el representante principal del mecanismo a través del cual se explica el pre condicionamiento[28]; sin embargo la hipótesis mitocondrial propone otra vía para explicar el pre condicionamiento[28]. Se ha demostrado que el *simendan* abre los canales de K^+ dependientes de ATP en los hepatocitos y en los miocardiocitos[29]. Este efecto se inhibe con la adición de un bloqueador selectivo de éstos canales, el 5 - *hidroxidecanoato*. El *simendan* a concentraciones de hasta 2,2 M no tiene ningún efecto sobre la respiración mitocondrial, por lo que su efecto anti-isquémico es a través de su efecto sobre los canales de K^+ ATP dependientes[30].

Efecto anti-inflamatorio y anti-agregación

El *simendan* inhibe la agregación plaquetaria inducida por *ADP* a una concentración de (10 M), e inducida por *colágeno* a una concentración de (2 a 5 mg/mL) en plasma humano enriquecido en plaquetas[31]. Tanto el *levo* como el *dextrosimendan* inhiben la producción de *ON* (*oxido nítrico*) en una manera dosis dependiente en macrófagos y fibroblastos expuestos

a un estímulo inflamatorio y reducen la producción de $IL - 6$, sin tener efecto sobre la síntesis de TNF [32].

1.6. Distrofias musculares

La distrofia muscular es un grupo de enfermedades hereditarias, caracterizadas por una debilidad progresiva y un deterioro de los músculos esqueléticos, que controlan el movimiento y la postura. Sin embargo también hay un efecto sobre la forma y función del músculo cardíaco y músculo liso. Dependiendo del tipo de distrofia, se afecta a personas de diferentes edades y varían los músculos afectados, la rapidez de la degeneración y por lo tanto la severidad de los síntomas.

Los tipos de Distrofia Muscular más frecuentes son:

- De Duchenne
- De Becker
- Miotónica
- Del anillo óseo
- De Erb (Facio-escápulo-humeral)
- Congénita
- Oculofaríngea
- Distal
- De Emery-Dreifuss

La forma más frecuente y grave es la distrofia muscular de Duchenne, que afecta a jóvenes varones con una expectativa de vida alrededor de los 20 años. Las complicaciones serias en más del 80 por ciento de los pacientes están relacionadas con problemas pulmonares, donde hay insuficiencia ventilatoria (respiratoria) por la afección de los músculos intercostales y el diafragma, que se complica con cuadros infecciosos graves.

Las distrofias musculares son causadas por un defecto en un gen. Las diferentes formas de la distrofia muscular se pasan de los padres a los hijos de acuerdo a uno de los patrones de herencia:

- **Dominante.** En la herencia autosómica dominante, las anomalías generalmente aparecen en cada generación y cada niño afectado tiene un padre igualmente afectado y cada niño de padre afectado tiene un 50 % de probabilidades de heredar la enfermedad.
- **Recesivo.** En la herencia autosómica recesiva, el gen normal puede suplir la función del anormal, por lo que para que se desarrolle la enfermedad es necesario que los dos pares de genes se encuentren afectados.
- **Herencia recesiva ligada al cromosoma X.** La incidencia de la enfermedad es mucho mayor en los hombres. Como el gen anormal lo aporta el cromosoma X , los hombres no lo transmiten a sus hijos sino a todas sus hijas.
- **Herencia dominante ligada al cromosoma X.** El gen defectuoso se manifiesta por sí mismo en las mujeres, aun en la presencia de un cromosoma X normal. Los hombres pasan su cromosoma Y a sus hijos varones, por lo que los padres afectados no tendrán hijos varones afectados, pero sí tendrán todas las hijas mujeres afectadas.

Actualmente se sabe que todas las formas de distrofia muscular son causadas por defectos genéticos y se conocen a los genes implicados y las proteínas que éstos sintetizan.

1.6.1. Síntomas

Las contracturas musculares aparecen después del debilitamiento muscular y son el síntoma que más comúnmente se presenta en la distrofia muscular, especialmente en la DM tipo Duchenne y Becker. Los músculos se acortan y pierden elasticidad, provocando que las articulaciones se vayan apretando poco a poco, perdiendo movilidad. Con el tiempo se convierte en un problema muy importante ya que limita su movilidad y aumenta los efectos del debilitamiento físico. Por ello es importante prevenir y minimizar sus efectos. Las contracturas se producen por:

- Proceso de fibrosis. el tejido muscular al verse dañado continuamente y no poderse regenerar correctamente por efecto de la enfermedad, es suplido en parte por tejido fibroso y graso. Este nuevo tejido a diferencia del muscular normal, no tiene las mismas capacidades de flexibilidad y elasticidad, por lo que hace que el músculo tienda a acortarse con el tiempo, haciéndose menos funcional y limitando la movilidad de la articulación.
- Falta de movilidad de las articulaciones.
- Debilitamiento impar de los músculos que mueven las articulaciones. Es más notorio en los músculos que levantan y bajan la punta del pie, donde el músculo flexor se ve más debilitado que el músculo extensor, provocando la marcha característica de la DM: caminar de puntas.

Las articulaciones que se ven más afectadas son los hombros, caderas, rodillas, codos, tobillos, muñecas y los dedos. En las rodillas, codos y dedos se caracteriza por no poder extender la articulación. En el tobillo hay dificultad para levantar la punta del pie y poner el pie en ángulo recto. En la muñeca hay dificultad de levantar la mano con la palma hacia abajo.

La distrofia muscular no solamente afecta los músculos de las extremidades, mientras avanza la enfermedad se ven afectados el corazón y los músculos respiratorios. La cardiomiopatía se presenta normalmente de dos formas:

- Aumento de tamaño: las paredes del músculo cardiaco crecen de tamaño y las cámaras principales de bombeo, los ventrículos, tienen menos espacio para contener la sangre.
- Dilatación: el músculo del corazón se dilata y expande; los ventrículos se hacen más espaciosos y "flácidos".

En cualquiera de los dos casos, si el problema es muy severo se produce una insuficiencia cardiaca, lo que significa que el corazón no puede satisfacer adecuadamente las necesidades de sangre y nutrientes (oxígeno) de los tejidos.

1.6.2. Epidemiología

La *DM* tiene una distribución mundial, y no hay país donde no haya individuos afectados por algún tipo de distrofia muscular. Se considera que la *DM* en general tiene una incidencia

cercana a 1 en cada 2000 nacimientos[8].

1.6.3. Diagnóstico

Al ser una enfermedad hereditaria, son muy importantes los antecedentes familiares. Detalles de cómo y cuándo se presentó la debilidad por primera vez, su nivel de severidad, y los músculos afectados. Se determina la fuerza de los músculos de los brazos, piernas, hombros, caderas y de los músculos faciales. Cada enfermedad neuromuscular muestra un patrón típico y específico. El diagnóstico está basado en gran medida en los patrones musculares detectados durante el examen clínico y es determinante el estudio histopatológico y genético para algunas *DM*.

A continuación se describen algunos métodos de diagnóstico para detectar la *DM*:

Biopsia muscular

Se estudia un pequeño trozo de tejido muscular del paciente (biopsia) generalmente a una profundidad de *2cm*. Frecuentemente la biopsia permite al médico determinar si el trastorno es distrofia muscular y cuál es la forma en que se presenta. La biopsia se hace sobre el tejido muscular, siendo una cirugía leve, utilizándose solo anestesia local en la mayoría de los casos.

Electromiografía

Se colocan pequeños electrodos dentro de los músculos y se crea una gráfica que indica el estado de salud de los músculos y nervios del organismo. Cuando un músculo se contrae, se produce un flujo eléctrico en el tejido muscular en respuesta a la señal eléctrica de los nervios. El patrón de éste flujo eléctrico se conoce muy bien en un músculo sano. En el caso de la distrofia muscular, el tejido muscular funciona de manera anormal, por lo que el flujo eléctrico en respuesta a la señal eléctrica de los nervios será anormal, produciendo un patrón anormal de este flujo, el cual puede ser reconocido.

Análisis de sangre

Los exámenes de sangre son útiles puesto que los músculos en deterioro liberan enzimas que se pueden detectar en la sangre. La presencia de estas enzimas en la sangre en niveles mayores a los normales puede ser indicación de distrofia muscular. El valor de estas pruebas es elevado

en las etapas iniciales de la enfermedad, incluso puede mostrar indicios antes de comenzar los síntomas. Una vez instaurada la enfermedad, la masa muscular puede estar tan reducida, que los niveles de proteínas de suero en plasma estén normales: *Creatina Kinasa*.

Exámenes genéticos

En algunos tipos de *DM* es posible examinar el código genético de la persona afectada, buscando la existencia de algún problema con un gen relacionado a alguno de esas variantes de la enfermedad. En general este tipo de examen genético es de uso reciente, y debido a que en sólo algunos tipos de *DM* se conoce con seguridad la localización del gen anormal, no siempre es posible utilizarla para todos los tipos.

Aun a pesar de lo anterior, cuando se conoce bien el gen implicado, es de gran exactitud, e incluso sirve para identificar a una persona portadora y conocer sus posibilidades de heredar el padecimiento ya que se trata de enfermedades progresivas que siguiendo su curso natural, pueden terminar con la muerte o con graves limitaciones.

Todos los tipos de *DM* empeoran de forma progresiva, pero la velocidad y magnitud de la discapacidad son variables. La distrofia muscular de Becker se vuelve una discapacidad progresiva lenta. Aunque es posible tener una vida relativamente normal, la muerte ocurre después de los 40 años.

1.6.4. Tratamiento

Por el momento no existe cura o tratamiento para detener o revertir el desarrollo de las *DM*. La terapia física no puede detener el proceso de la enfermedad, ni restaurar el tejido muscular afectado, pero podrá ayudar a mantener funcionando los músculos que aún se encuentran saludables y demorar el inicio de contracturas.

1.7. Distrofia muscular de *Erb*

1.7.1. Clasificación

La distrofia muscular de *Erb* (*DME*), también conocida como Distrofia de cintura (*Limb-girdle muscular dystrophies*; *LGMD1* y 2) es una enfermedad producida por una serie de

defectos genéticos heredados de manera autosómica, que consisten en una degeneración progresiva de la musculatura principalmente de la cintura, hombros y pelvis [34], sin excluir a los demás músculos. La *DME* es un grupo heterogéneo de enfermedades, desde el punto de vista clínico y genético y su clasificación se basa: primero en la manera en cómo se transmite por la herencia, de tal suerte que la tipo 1 es para las formas autosómicas dominantes y la tipo 2 para las formas autosómicas recesivas; además también se clasifican por los genes conocidos y sus loci, ver (Tabla1)[33].

NOMBRE	GEN	PRODUCTO	LOCUS
LGMD	<i>Miotilina</i>	(MYOT)	5q22 – q34
LGMD 1B	<i>lamina A/C (LMNA)</i>	(LMNA)	1q11 – q21
LGMD 1C	<i>caveolina – 3</i>	(CAV3)	3p25
LGMD 1D		CMD1F	6q23
LGMD 2A	<i>Calpaina3</i>	(CAPN3)	15q15 – q21
LGMD 2B	<i>Disferlina</i>	(DYSF)	2p13
LGMD 2C	γ – <i>Sarcoglicano</i>	(SGCG)	13q12
LGMD 2D	α – <i>Sarcoglicano</i>	(SGCA)	17q12 – q21
LGMD 2E	β – <i>Sarcoglicano</i>	(SGCB)	4q12
LGMD 2F	δ – <i>Sarcoglicano</i>	(SGCD)	5q33 – q34
LGMD 2G	<i>Teletonina</i>	(TCAP)	17q11 – q12
LGMD 2H	<i>TRIM32</i>	(Lligasa de <i>ubiquitina</i> E3)	9q31 – q34
LGMD 2I	Prot. relacionada a <i>Fukutina</i>	(FKRP)	19q13
LGMD 2J	<i>Titina</i>	(TTN)	2q31

Tabla1: Clasificación de las Distrofias

La *DME* recesiva (*LGMD*) 2C – 2F, es el resultado de la mutación de genes asociados con la expresión de proteínas de membrana que componen a los *Sarcoglicanos* (*SGs*). Esta *DME* se debe a la pérdida parcial o total de las proteínas del complejo *SG*[35][36], en donde se pierde la regulación del eje *DGC*. A nivel celular esta distrofia se caracteriza por defectos en la permeabilidad de las membranas, degeneración y regeneración de miofibrillas, se reemplazan miofibrillas por tejido conectivo y/o adiposo y una concentración elevada de cretina cinasa sérica

y tisular[37][38]. El complejo DGC consiste además del sucomplejo *sarcoglicano* – *sarcospan* ($SG - SSPN$) y algunas proteínas citosolicas como la *distrobrevina* y *sintrofina*s[39].

El complejo $SG - SSPN$ está compuesto por las proteínas transmembranales $\alpha-$, $\beta-$, $\gamma-$, $\delta-SGs$, y el *sarcospan* ($SSPN$). Las proteínas del complejo SGs tienen un dominio intracelular corto, un cruce transmembranal y un dominio extracelular largo que se encuentra *N-glicosilado* y contiene residuos de cisteína que están extensamente conservadas entre especies[40]. Recientemente se han dado evidencias que demuestran la localización no solo sarcolemal sino también en el Reticulo Sarcoplasmico del $\gamma-$, $\delta - SGs$, que aparece independientemente de la deficiencia de *distrofina*[41][42][43]. Esta evidencia muestra que estas proteínas están involucradas en la regulación del *calcio*. En miotubos de un modelo de hamsters BIO14.6, se mostró que una deficiencia en $\gamma-$, $\delta - SGs$, tenía una homeostasis anormal del Ca^{2+} intracelular. Este modelo animal espontaneamente desarrollaba distrofia muscular y cardiomiopatía, lo que se demostró por la ausencia del gen que codifica para el $\gamma - SG$ [44].

La salida de *calcio* del retículo sarcoplasmico a través del canal de *calcio* del receptor de *rianodina* y la captura de *calcio* del RS por la $SERCa$ ($ATPasa$ de *calcio*) son los mecanismos principales para regular las cocentraciones de *calcio* intracelular durante la contracción/relaxación muscular. Ueada et. al [41] usando inmuno microscopía electrónica determinaron la presencia del $\gamma - Sarcoglicano$ a lo largo de la sarcolema y en las estriaciones sobre la *banda - I*, incluyendo las diferentes fracciones del SR . El $\gamma - sarcoglicano$, se expresa más ampliamente en el RS [41] y su expresión no se ve afectada por la ausencia de *distrofina*. Estos resultados dan un indicio de la función intracelular del $\delta - Sarcoglicano$ [45][46].

Capítulo 2

Planteamiento del problema

El músculo esquelético es el tejido más abundante del ser humano y comparte características estructurales y funcionales con el músculo cardiaco y liso. Su actividad contráctil permite su estudio a través de la caracterización de sus propiedades mecánicas.

La fuerza de contracción es una característica que se puede modificar mediante el uso de fármacos, pero también se modifica naturalmente cuando se presentan enfermedades como las distrofias musculares.

El uso de fármacos para aumentar la fuerza de contracción del corazón, presenta también un efecto sobre los otros tipos de músculo (esquelético y liso) y los daños observables del músculo esquelético en las distrofias musculares también tienen un efecto sobre los otros dos tipos de músculo (cardiaco y liso).

A partir del análisis mecánico de la fuerza de contracción isotónica del músculo esquelético en dos condiciones diferentes: una donde se incorpora un agente inotrópico positivo cardiaco y un caso de distrofia muscular de *Erb* que supone una disminución en la fuerza de contracción se busca entender la fisiopatología muscular para lograr estar en condiciones de proponer la terapéutica.

2.1. Objetivo

Mediante el análisis mecánico de la fuerza de contracción del músculo esquelético aislado determinar el comportamiento mecánico del músculo en función del tiempo en los diferentes pasos del protocolo de estimulación en dos situaciones distintas:

- La utilización de un fármaco inotrópico positivo cardiaco
- La ausencia de δ – *sarcoglicano*, una proteína costamérica que da origen a la distrofia muscular de Erb.

2.2. Hipótesis

- La acción farmacológica de inotrópicos musculares cardiacos tales como L-simendan supone un efecto análogo en los diferentes tipos de fibras musculares (lisas y estriadas).
- Las Distrofias Musculares causan de manera general daños progresivos irreversibles disminuyendo la fuerza de contracción de los músculos.

Por lo que en las dos condiciones expuestas encontraremos importantes cambios en las propiedades mecánicas de contracción del músculo a partir de las dos condiciones expuestas, se determinarán las propiedades mecánicas de la fuerza de contracción mediante un protocolo específico de estimulación en el músculo aislado que servirán como diagnóstico de la fisiopatología a nivel celular.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. Animales

3.1.1. Ratones

Para el estudio farmacológico se utilizaron ratones machos de la cepa *CD - 1* con peso alrededor de $27g$ proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, Figura (3-1 A). De sus extremidades posteriores, se disecan los músculos *Extensor Digitorum Longus* (músculo rápido) y *Sóleo* (músculo lento).

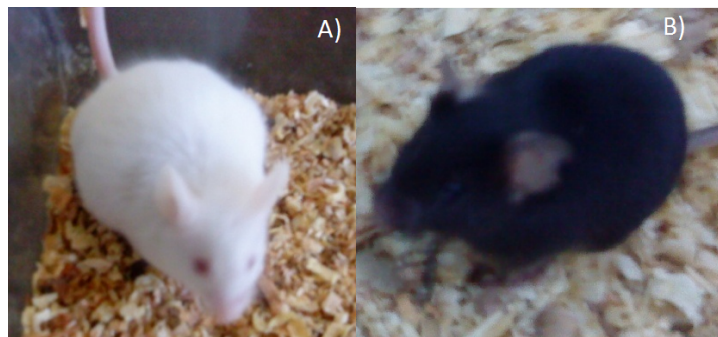


Figura 3-1: A) Ratón de la cepa *CD - 1*, B) Raton de la cepa *B6,129 - Sgcd^{tm1Mcn}/J*

Para la determinación de la fuerza de contracción en el modelo de distrofia muscular se utilizaron ratones $\delta - SG$ *KnockOut* (*KO*) carentes de $\delta - sarcoglicano$, la cepa es *B6,129 - Sgcd^{tm1Mcn}/J* Figura (3-1, B) los cuales fueron comprados de *Jackson Laboratory* (Bar Har-

bor, ME), y proporcionados por el Dr. Ramón Coral para este estudio. Estos ratones fueron sacrificados de manera análoga a los *CD-1* (Figura (3-1, A)) a la edad de 6 meses. Estos ratones no sintetizan una de las *PAD*, el δ -sarcoglicano, lo que resulta en una de las *DM*, conocidas como Facio-escapulo humeral (*DM* de *Erb*).

3.2. Fármacos y soluciones

3.2.1. Solución de Krebs

Se utilizó la solución de Krebs en todos los procedimientos, desde la disección del músculo hasta cumplir los protocolos de estimulación.

Sustancia	M	PM	Gramos/Litro
<i>NaCl</i>	0,135	58,44	7,89
<i>KCl</i>	0,005	74,55	0,373
<i>MgCl</i>	0,001	203,3	0,203
<i>NaHCO₃</i>	0,015	84,01	1,26
<i>Na₂HPO₄</i>	0,001	142	0,142
<i>C₆H₁₂O₆</i>	0,011	180	1,98
<i>CaCl₂</i>	0,0025	147	0,0367

Tabla2: Componentes de la Solución de Krebs

Los componentes de la solución de Krebs (Tabla2) dan un *pH* de 8,06, el cual se modifica por el burbujeo con un gas cuya composición es *O₂* al 95% y *CO₂* al 5%, que reduce el *pH* a 7,0 lo cual es fisiológicamente compatible con el interior de la célula muscular.

3.2.2. Simendan

Se usó el isómero *levógiro* del *simendan* (*L-Simendan*) a las siguientes concentraciones:

- 1000 μ M
- 300 μ M
- 90 μ M

- $60\mu M$
- $30\mu M$

3.3. Aislamiento de los músculos

Para el desarrollo de este trabajo se usaron dos tipos de músculos en criterio a su metabolismo y desempeño; rápido y lento, los cuales son *extensor digitorum longus* (*EDL*) y *Sóleo*, respectivamente. El *EDL* (Figura3-2) se encuentra en la parte anterior externa de la pierna en humanos, en la región superior está inserto en la cara frontal de la rótula en donde presenta un mayor calibre/diámetro en comparación a la parte inferior. El tendón de la parte baja presenta cuatro ramificaciones y cada una se inserta en la falange de cada dedo de manera independiente a las otras, controlando de esta manera el movimiento extensor de los dedos.

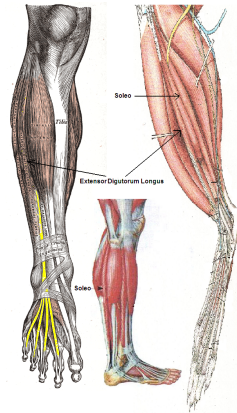


Figura 3-2: Localización del *EDL* y *Soleo* en humano y en el ratón.

En contraparte, el *sóleo* que se encuentra en el lado externo de la extremidad inferior en el humano y más profundo en la rata, ejecuta movimientos contráctiles de los dedos. Por su parte proximal, se encuentra inserto en la cabeza, borde y cara posterior del peroné y en la parte distal se une al talón de Aquiles; mediante una aponeurosis que se estrecha y contribuye a cubrir al músculo *gastrocnemius*, los tendones de ambos músculos constituyen al tendón de Aquiles que se inserta en el hueso calcáneo.

Los animales se sacrificaron mediante la dislocación de las vértebras cervicales posteriormente se procedió a retirar la piel de las extremidades inferiores para su extracción y colocarlas bajo el microscopio para la disección de los músculos mencionados. Se separó la pierna con extremo cuidado para no comprometer la integridad estructural y funcional de los músculos evitando cortes innecesarios en zonas de inserción e inervación.

Para la disección de los músculos se utilizó el microscopio (*WildM-8; Heerbrugg, Switzerland*) e instrumental para microcirugía del laboratorio de Fisiopatología de músculo de la Facultad de Medicina, Figura (3-3).

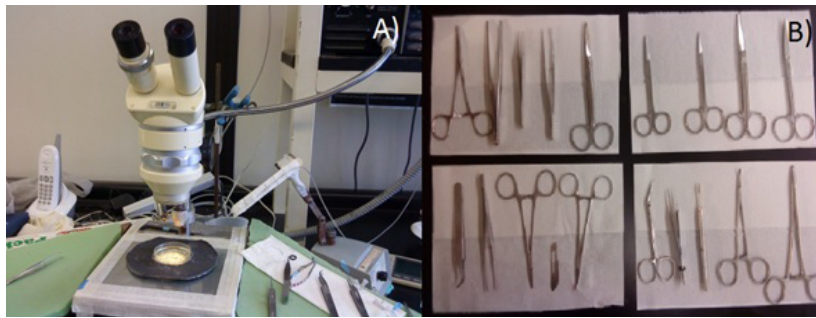


Figura 3-3: A)Microscopio, B)instrumental quirúrgico.

Una vez extraído el músculo en su totalidad se coloca en una caja de acrílico (Petri) con solución de *Krebs*, siempre en presencia de burbujeo de gas. La caja Petri tiene en el fondo un gel que permite colocar fijadores en los tendones del músculo para inmovilizarlo y poder atarlo con hilo quirúrgico en la cámara de estimulación. El hilo usado fue de calibre 3 – 0 usado comúnmente en suturas pequeñas y los nudos se hicieron en cada extremo del músculo sujetando firmemente los tendones y creando un lazo pequeño para inmovilizar uno de los extremos al sujetador fijo de la cámara y el otro a la parte móvil del transductor (Figura3-4).

3.4. Procedimiento experimental.

El músculo es colocado en la cámara de estimulación e inmerso en solución de *Krebs* (en el caso distrófico y en una mezcla de solución de *Krebs* y *L – simendan* a la dosis indicada) y expuesto a los electrodos de platino (Figura 3-5), se sujeta de las asas en cada extremo y se

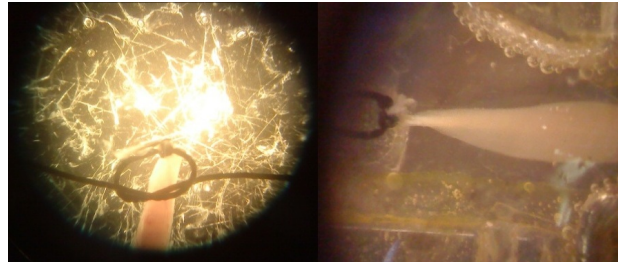


Figura 3-4: Nudos hechos en los tendones

tensa a la longitud en reposo (a la cual se encuentra cuando está inserto en el esqueleto), que es equivalente a 1,3 veces su longitud cuando está aislado (separado del hueso).



Figura 3-5: Músculo aislado y sujetado en la cámara de estimulación.

El equipo utilizado para llevar a cabo la estimulación es: Un estimulador (*GrassStimulator ML S – 88*); Transductor de Fuerza (*AD Instruments ML – 866*); Amplificador, fuente de poder; *NEXUS NPS – 1 ReseachLaboratory*, Figura (3-6).



Figura 3-6: Estimulador; Osciloscopio; transductor y fuente de poder y amplificador.

El arreglo experimental que se utilizó se muestra en la Figura (3-7); la parte inicial se desarrolla en el generador de pulsos (A) cuya señal se transmite hacia la cámara de estimulación (B) donde se encuentran colocados electrodos de platino a ambos lados del músculo, que son las piezas encargadas de entregar la descarga al líquido en el cual se encuentra inmerso el músculo. Dado que uno de los extremos en los que se encuentra sujeto el músculo es fijo, el movimiento y fuerza con que el músculo se contrae es registrado por la parte móvil que consta de un circuito que es sensible al movimiento y la señal mecánica es convertida a un impulso eléctrico el cual es capturado y digitalizado por el transductor (C) una vez que es amplificado. La información es almacenada y analizada en un ordenador convencional (D) con la paquetería para el análisis *Lab Chart Pro 6*.

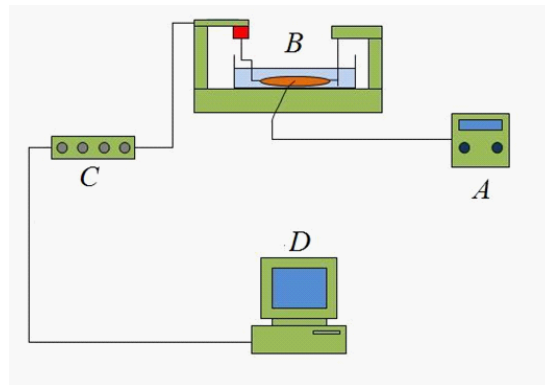


Figura 3-7: Esquema del arreglo experimental

3.4.1. Protocolo de estimulación.

1. **Sacudida simple.** Para asegurar la contracción y corroborar la integridad del músculo de posibles daños durante la extracción se realizaron sacudidas simples (*twitch*) que constan de un solo impulso eléctrico generando una cresta con una amplitud característica para cada tipo de músculo. Se aplicó el mismo protocolo de estimulación iniciando con tres sacudidas simples en intervalos de 2 minutos para cada músculo.
2. **Tétanos.** Para medir la fuerza que el músculo es capaz de desarrollar, se usaron estimulaciones tetánicas consistentes en una descarga eléctrica con una duración de 1 segundo

a una frecuencia de 75 Hz y a una diferencia de potencial de 70 V , en intervalos de cinco minutos siendo tres tétanos en totalidad.

3. **Fatiga.** El músculo se sometió a fatiga por medio de tétanos en un tren de 2 segundos, es decir, un segundo de tétanos y un segundo de reposo por ciclo. Este ciclo se repitió tantas veces hasta que la fuerza de contracción llegara al 30 o 50% de la amplitud inicial.
4. **Recuperación.** El músculo que se somete a fatiga tiene la propiedad de recuperarse es decir la fatiga es un proceso reversible en el músculo sano. Propiamente consiste en que el músculo obtenga nuevamente una fuerza de contracción mayor a la desarrollada durante el último tétanos de la fatiga y tenga una tendencia de volver a la amplitud inicial.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Efecto de la carencia del δ -sarcoglicano en las propiedades mecánicas del músculo esquelético rápido EDL

4.1.1. Sacudida Simple

La Figura (4-1), muestra un registro obtenido a $70V$ y $75Hz$. No hay diferencia en la fuerza de contracción del músculo de Erb con respecto al músculo control, sin embargo se observa que al final de la relajación Figura (4-1) C, hay diferentes cinéticas de decaimiento que se ajustan a la ecuación (4.1).

$$y = A_1 e^{-\frac{1}{T}t}. \quad (4.1)$$

Donde $T = \frac{1}{\tau}$ representa la constante de decaimiento. Tiene un valor de $0,03 \pm 0,002 \text{ seg}$ para el caso control y $0,02 \pm 0,002 \text{ seg}$ para el músculo de Erb.

Lo que indica que para el caso distrófico la cinética es más baja que en el caso control, esto significa que el caso distrófico tarda más tiempo en incorporarse a la línea basal. Este fenómeno se enfatiza en la Figura (4-1) C, donde se puede ver (en rojo) el registro del músculo distrófico y en negro el control.

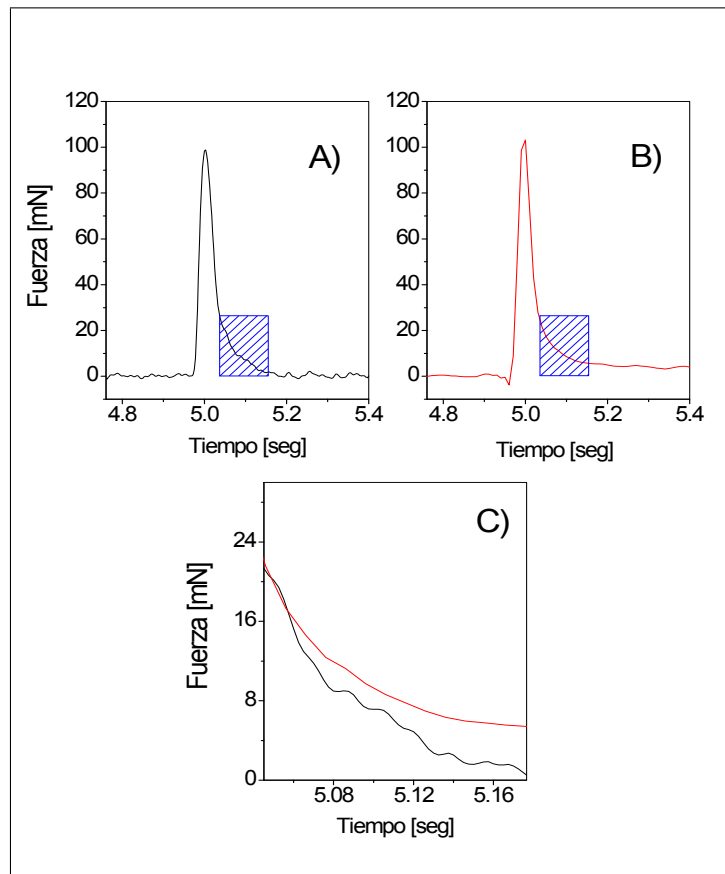


Figura 4-1: Sacudida simple del músculo rápido *Extensor digitorum longus* (EDL). A) Control, B) músculo de Erb. En ambos registros el cuadro marca la fase final de la relajación muscular. C) Es la amplificación del cuadro en las graficas A y B, en donde se observa la diferencia en la en la cinética de relajación al final de la Sacudida Simple del EDL.

4.1.2. Estimulación Tetánica

La Figura (4-2) muestra un registro obtenido de tres estimulaciones consecutivas a una frecuencia de estimulación de 70 Hz durante 5 seg con periodos de reposo de 7 seg entre cada estimulación. En la Figura (4-2) A se observa la perdida de tensión del músculo control de manera consecutiva durante los tres tétanos conservando la misma pendiente, registrándose una disminución de la fuerza de contracción total que va de los 259 mN a los 177 mN , lo que representa una pérdida del 32% respecto a la tensión máxima del tétanos inicial.

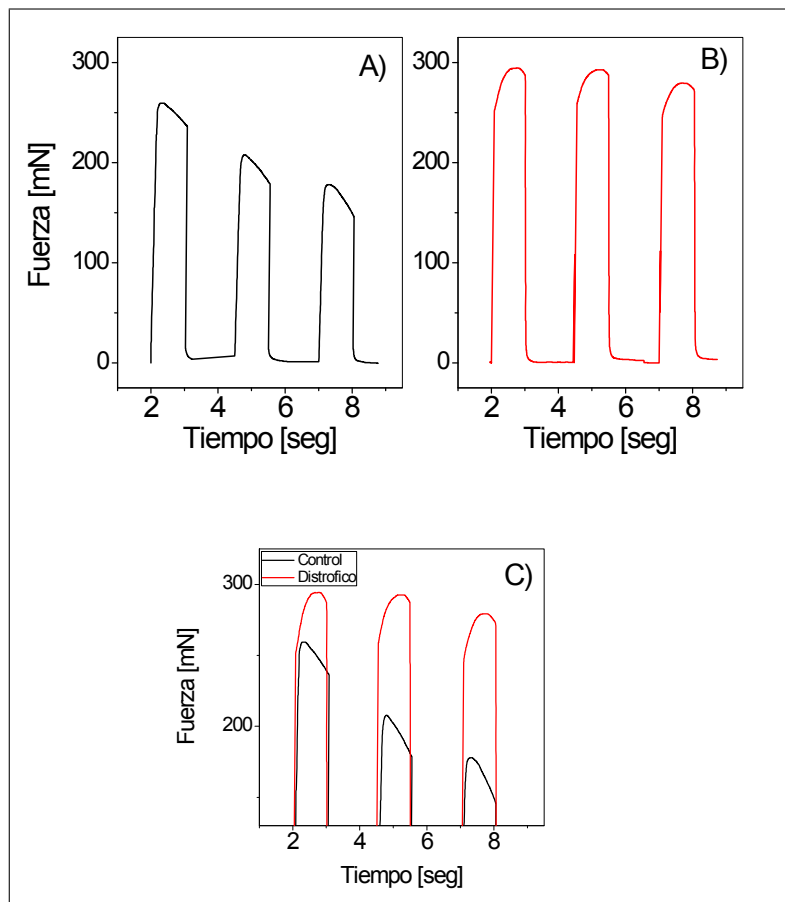


Figura 4-2: Estimulación Tetánica en el músculo *EDL*. A) Control, B) Con *Distrofia*. En ambos registros tres estimulaciones consecutivas con descansos de 7 seg . C) Es la amplificación comparativa de las graficas A y B, en donde se observa la diferencia en la fuerza en la fase final de la contracción.

La Figura (4-2) *B* muestra el efecto de la estimulación tetánica para el músculo de *Erb*, en este caso se presenta un aumento de tensión a lo largo del protocolo conservando la misma forma en cada tétanos. En la Figura (4-2) *C* se muestra la comparación de los cambios en la tensión durante el proceso de estimulación, en donde se observa que hay una ganancia neta de tensión del músculo de *Erb* en comparación con el control, del 13,5 %, en primer tétanos; 40,7 % en el segundo tétano y 57 % en el tercer tétanos. En el músculo de *Erb* el desarrollo de tensión se lleva a cabo con dos cinéticas distintas; una componente lineal desde el principio de la estimulación hasta los 250 *mN*, una componente de crecimiento logarítmico que va desde los 250 *mN* hasta la tensión máxima 295 *mN*, lo que sucede alrededor de los 3 *seg* después de iniciado el estímulo y finalmente se observa un decaimiento de tensión que va de los 3 *seg* hasta el final de la estimulación.

4.1.3. Coeficiente de desvanecimiento

En la Figura(4-3) se expone el coeficiente de desvanecimiento resultante del cociente entre el final de la fase rápida durante el inicio del estímulo tetánico (punto que define el final de la parte lineal, en la que se desarrolla el 85 % de la fuerza en un periodo de 0.5 segundos y el inicio de la parte logarítmica del estímulo) y el principio de la relajación (punto en el que finaliza el estímulo tetánico. Para cada caso (músculo control y músculo distrófico) no se aprecian diferencias entre la magnitud del coeficiente de desvanecimiento durante las tres estimulaciones tetánicas (P1, P2 y P3). Las diferencias aparecen al comparar los resultados entre los dos modelos; para el caso control (Figura(4-3) en negro) el coeficiente de desvanecimiento sostiene la misma proporción a lo largo de las estimulaciones y presenta valores que son <1 , lo que indica que el final de la parte lineal de la estimulación tiene valores mayores que para el inicio de la relajación y que cada estimulación termina con una producción de fuerza menor a la que se comenzó. Por otro lado, para el músculo de *Erb* (Figura(4-3) en rojo) se observa que los coeficientes de desvanecimiento también mantienen la misma proporción durante las tres estimulaciones pero con valores >1 , lo cual muestra que el final de la parte lineal está por debajo de la parte en la que finaliza el estímulo y de la misma manera que al final de la estimulación se produjo una fuerza mayor a comparación de la del inicio de la estimulación.

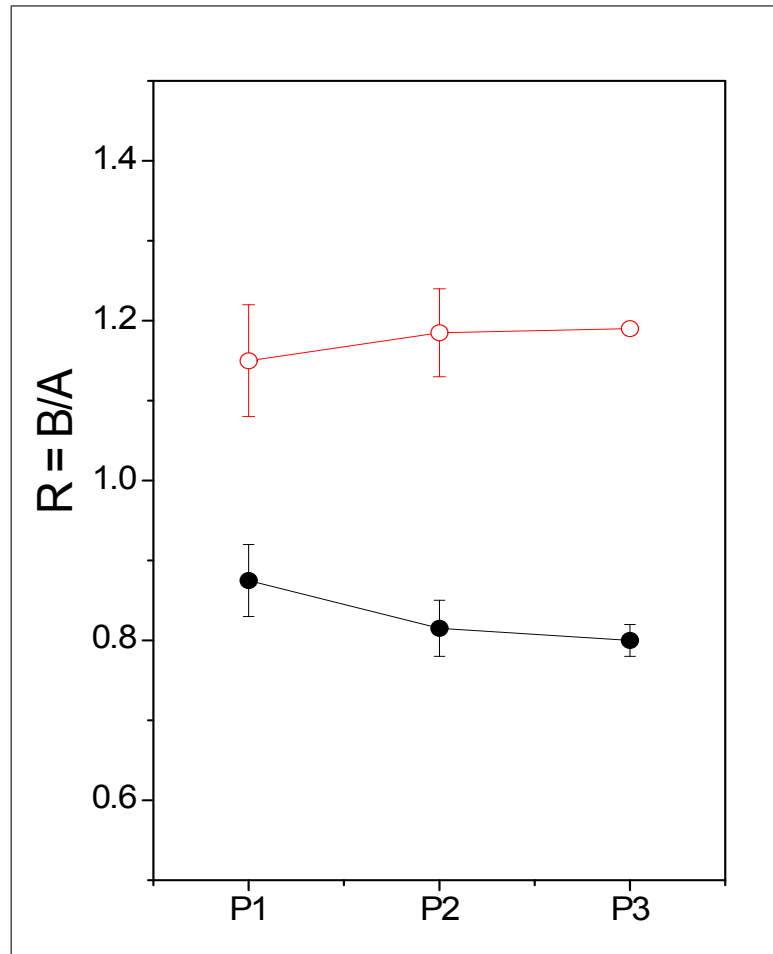


Figura 4-3: Cociente de desvanecimiento en las tres estimulaciones tetánicas consecutivas de la Figura 4-2 A) y B). (●) EDL control, (○) EDL con *distrofia*.

4.1.4. Fatiga

En la Figura (4-4) se muestra el resultado de la estimulación de alta frecuencia; 70 Hz, 1 segundo de estimulación alternando con un segundo de reposo. La Figura (4-4) A representa el protocolo para el músculo control y la Figura (4-4) B para el músculo de *Erb*. En ambos casos el protocolo de estimulación se prolonga hasta lograr una fatiga del 30% respecto a la fuerza del primer tétanos del tren de estimulación, lo que significa una tensión remanente del 70%. En la figura (4-4) C se muestra el promedio \pm SD con una n de 3 de la tensión normalizada. En ambos casos se alcanza el mismo valor de fatiga al mismo tiempo y siguiendo la misma trayectoria.

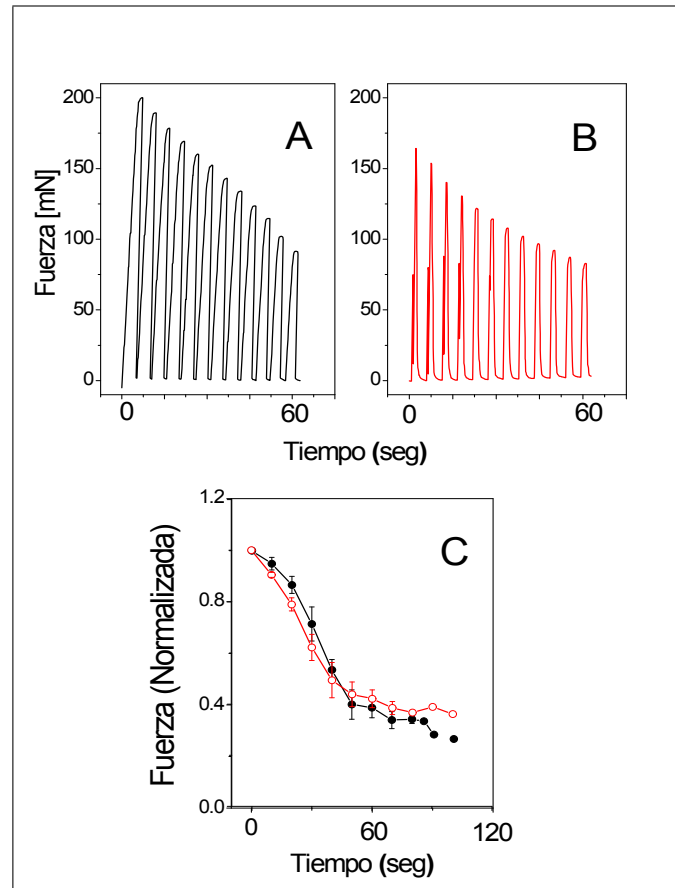


Figura 4-4: Registros representativos del desarrollo de fatiga por estimulación tetánica de alta frecuencia. A) *EDL* Control, B) *EDL* del Músculo de Erb. C) Fuerza normalizadas del promedio de cada una de las tensiones desarrolladas durante una fatiga al 30% (●) *EDL* control, (○) *EDL* con distrofia.

4.1.5. Recuperación después de la fatiga.

La Figura 4-5 A y B muestran el protocolo de fatiga y recuperación del músculo control y el músculo de *Erb* respectivamente, la Figura 4-5 C muestra el promedio de la tensión normalizada con respecto a la fuerza registrada al inicio del tren. En el caso control se observa una recuperación máxima del 85%. En el caso del músculo de *Erb* se presenta una pequeña recuperación por arriba del 50% de la fuerza inicial con un máximo al segundo tétanos, decayendo a partir de ese valor.

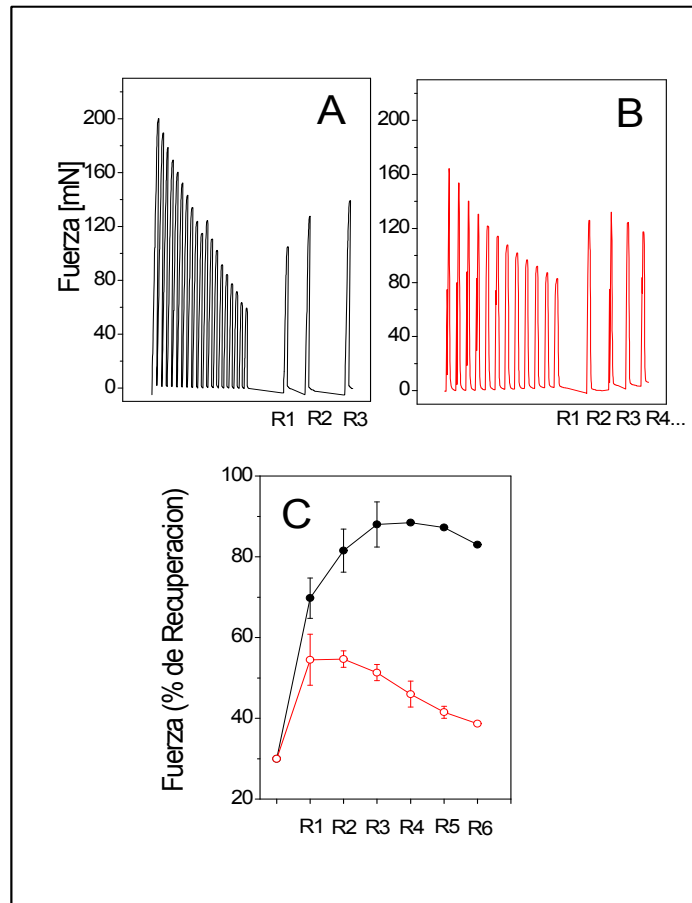


Figura 4-5: Registros representativos de la recuperación de la fatiga después del protocolo por estimulación tetánica de alta frecuencia. A) *EDL* Control, B) *EDL* con *Distrofia*. C) Fuerza normalizadas del promedio de cada una de las tensiones desarrolladas durante la fase de recuperación R es el pico de recuperación después de la fatiga (●) *EDL* control, (○) *EDL* con *distrofia*.

4.2. Efecto de la carencia de δ -sarcoglicano sobre las características mecánicas del músculo esquelético lento (*Sóleo*)

4.2.1. Sacudida simple

En la Figura (4-6) se observa una sacudida simple para los dos casos de estudio, siendo la Figura (4-6) A el correspondiente al músculo control y la Figura (4-6) B a la del músculo de *Erb*. Se puede observar que existe un mayor desarrollo de fuerza en el músculo de *Erb*. Las diferencias radican al igual que en la sacudida simple en el *EDL* en la caída de tensión en la fase final de la relajación.

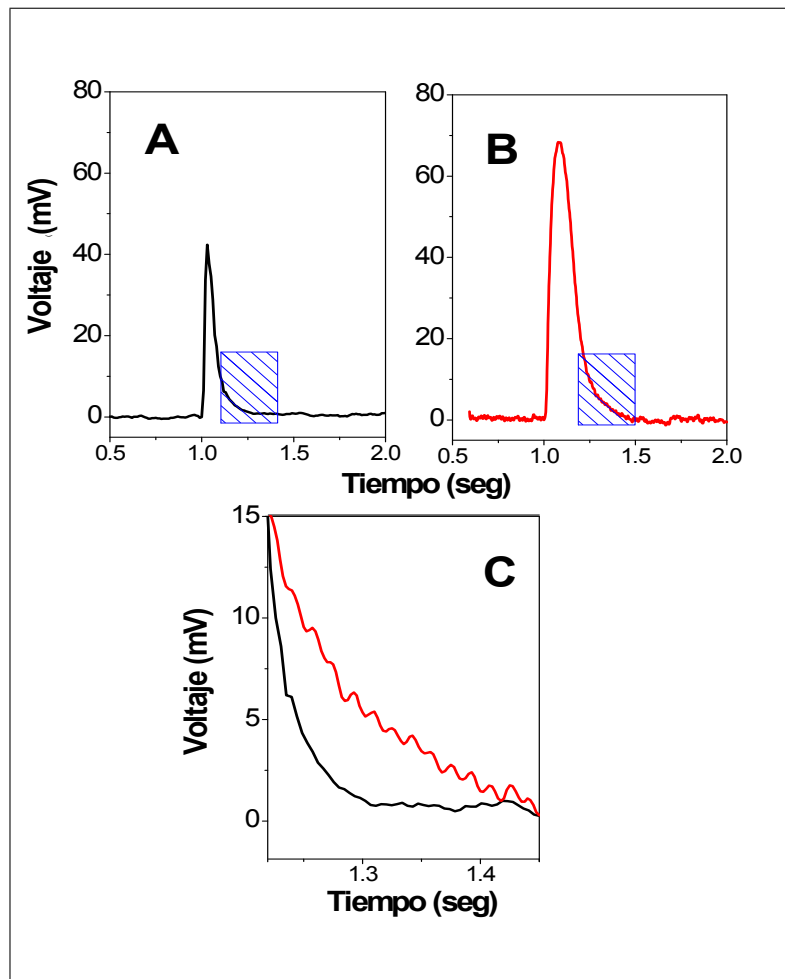


Figura 4-6: Sacudida simple del músculo lento *Sóleo*. A) Músculo Control, B) Músculo de Erb. C) Es la amplificación del cuadro en las gráficas A y B.

4.2.2. Estimulación Tetánica

La Figura (4-7), muestra los registros de estimulación tetánica usando los mismos parámetros de estimulación que para el músculo *EDL*. La Figura (4-7) *A* muestra el registro del músculo control en donde se observa que no hay pérdida de fuerza a lo largo de la duración del estímulo, lo que caracteriza al músculo lento por su metabolismo oxidativo. Tampoco hay pérdida de tensión a lo largo de las tres estimulaciones tanto en el caso control como en el caso distrófico. En la Figura (4-7) *B* se muestra la estimulación del músculo de *Erb* con los parámetros de estimulación antes descritos. Como se puede ver en las Figuras (4-7) *A*, *B* ninguno de los músculos (control y distrófico) perdió fuerza durante la estimulación tetánica, otro efecto que se observa en este tipo de estimulación es que la forma que presentan los tétanos es similar, presentando variaciones nulas para los tres tétanos. En la Figura (4-7) *C* se muestra la comparación de los cambios en la fuerza durante el proceso de estimulación, en donde se observa que hay una ganancia neta de tensión del músculo de *Erb* en comparación con el control; del 35,5%, en primer tétanos; 36,4% en el segundo tétano y 35,7% en el tercer tétanos. En el músculo de *Erb*, el desarrollo de tensión se lleva a cabo con dos cinéticas distintas; una componente lineal desde el principio de la estimulación hasta los 190 *mN*, una componente de crecimiento logarítmico que va desde los 190 *mN* hasta la tensión máxima 229 *mN*, lo que sucede alrededor de los 3 *seg* después de iniciado el estímulo; y finalmente se observa un decaimiento de tensión que va de los 3 *seg* hasta el final de la estimulación. De la misma manera, para el músculo control se observa que al inicio de la estimulación el desarrollo de fuerza tiene un comportamiento lineal desde 0 hasta alcanzar los 82 *N*, este proceso tiene lugar en un lapso de 0,4 segundos. Seguido de este comportamiento, presenta una forma en la que aún genera fuerza pero se realiza en un tiempo mayor mediante un comportamiento logarítmico desde los 82 hasta los 92 *N* en un tiempo de 0,6 segundos. La forma del tétanos después de estos patrones es una meseta que conserva el mismo comportamiento hasta finalizar el estímulo.

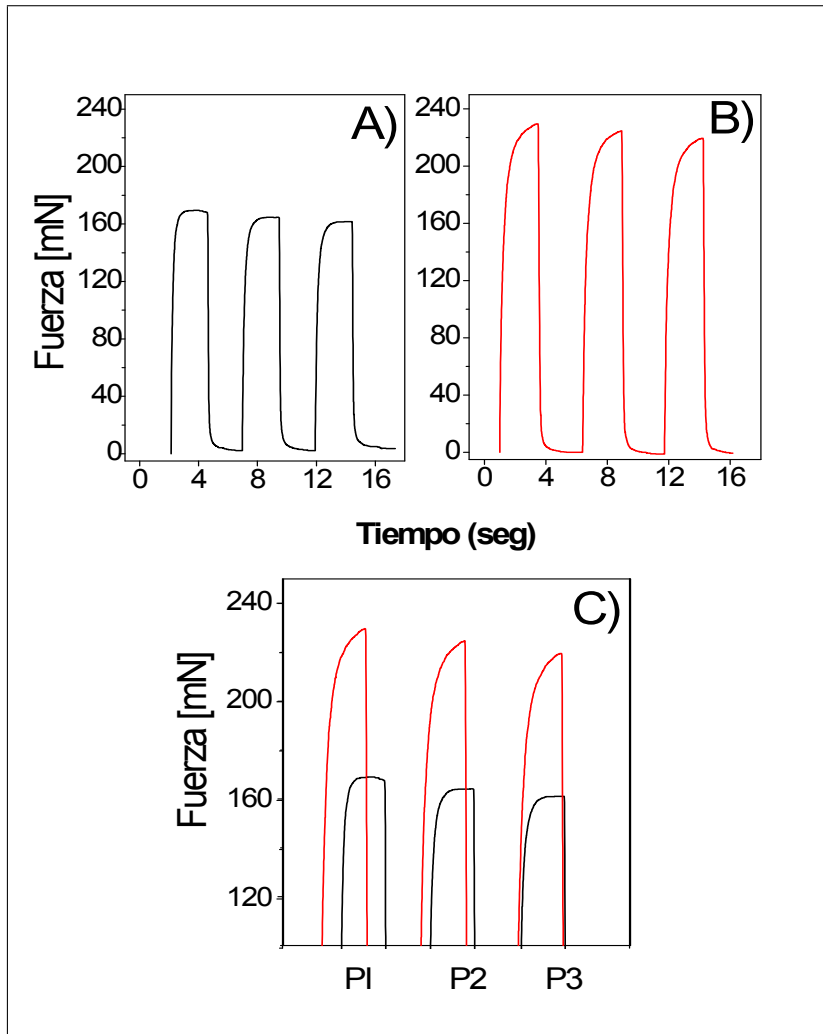


Figura 4-7: Estimulación Tetánica en el músculo *Sóleo*. Siendo la figura 4-7 A el Control, 4-7 B el músculo de *Erb*. 4-7 C Es la ampliación comparativa de las gráficas 4-7 A y B.

4.2.3. Coeficiente de desvanecimiento para el Sóleo

En la Figura (4-8) se muestra la razón de desvanecimiento para el Sóleo. Para el músculo control (mostrado en la Fifura(4-8) en negro) se observa un comportamiento casi horizontal, igualmente para el caso distrófico (Figura (4-8) en negro) pero con ligeras variaciones. Las diferencias importantes se presentan al comparar los músculos control y el de *Erb*, siendo en este último el cociente de desvanecimiento > 1 . Esta tendencia positiva muestra el incremento de la fuerza de contracción durante la estimulación. Por otro lado la razón de desvanecimiento para el músculo control es 1, lo que indica que cada estimulación termina con la misma tensión que con la que comenzó.

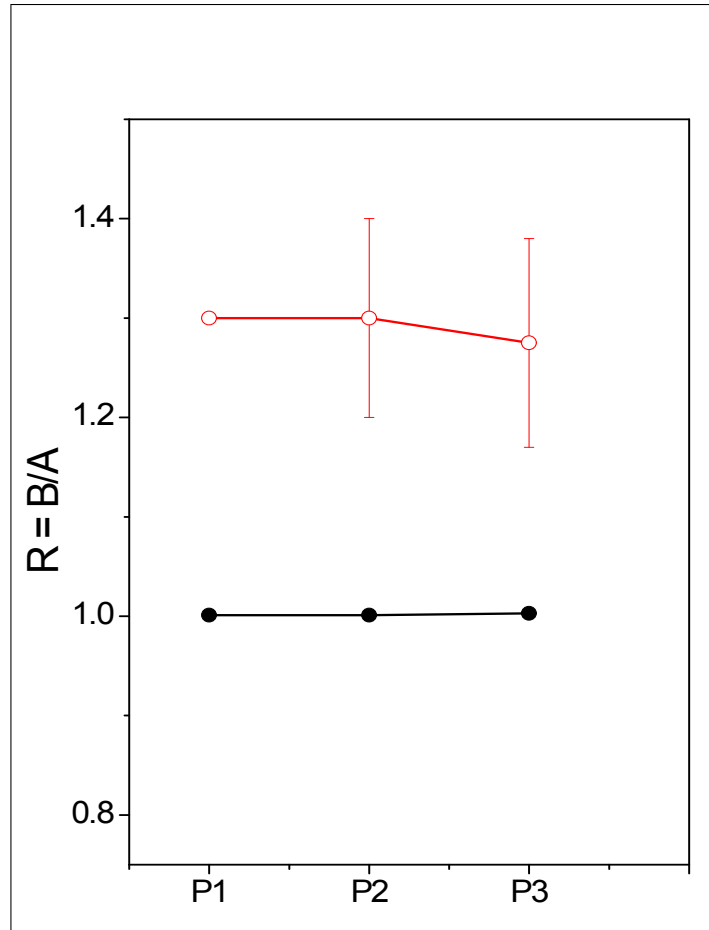


Figura 4-8: Cociente de desvanecimiento en las tres estimulaciones tetánicas consecutivas de la figura 4-8 A y B. (●) EDL control, (○) *EDL* con *distrofia*.

4.2.4. Fatiga

En la Figura (4-9) se presenta el protocolo de fatiga con los mismos parámetros de estimulación para ambos casos, la figura 4-9 A muestra el registro del el músculo control y la Figura (4-9) B la del músculo de *Erb*. En la Figura (4-9) C se puede observar que el valor de la fatiga al 30 % respecto al tétanos inicial se alcanza al mismo tiempo de estimulación con la misma tendencia de pérdida de tensión.

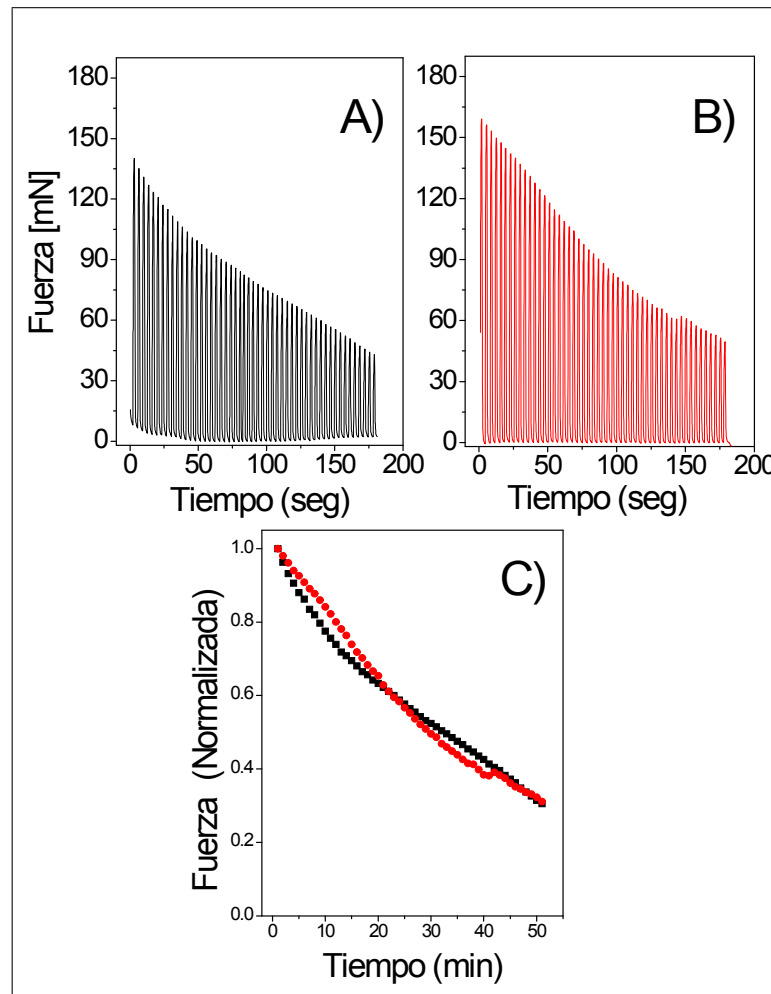


Figura 4-9: Registros Representativos del desarrollo de fatiga por estimulación tetánica de alta frecuencia. A) Soleo Control, B) *Soleo Erb*. C) Fuerza normalizadas del promedio de cada una de las tensiones desarrolladas durante una fatiga al 30 % (●) Soleo control, (○) Soleo Erb.

4.2.5. Recuperación después de la fatiga

En la Figura (4-10) A, B, se muestra el final de la fatiga donde se estimularon ambos músculos hasta lograr una fuerza de contracción del 30 % respecto al primer tétanos al inicio de la fatiga. A partir de la Figura (4-10) C se puede decir que la recuperación del Sóleo en el caso distrófico, alcanza el 40 % del tétanos inicial, lo que es bajo comparado con el 70 % que logra desarrollar el músculo control, indicando que el músculo de *Erb* no presenta recuperación.

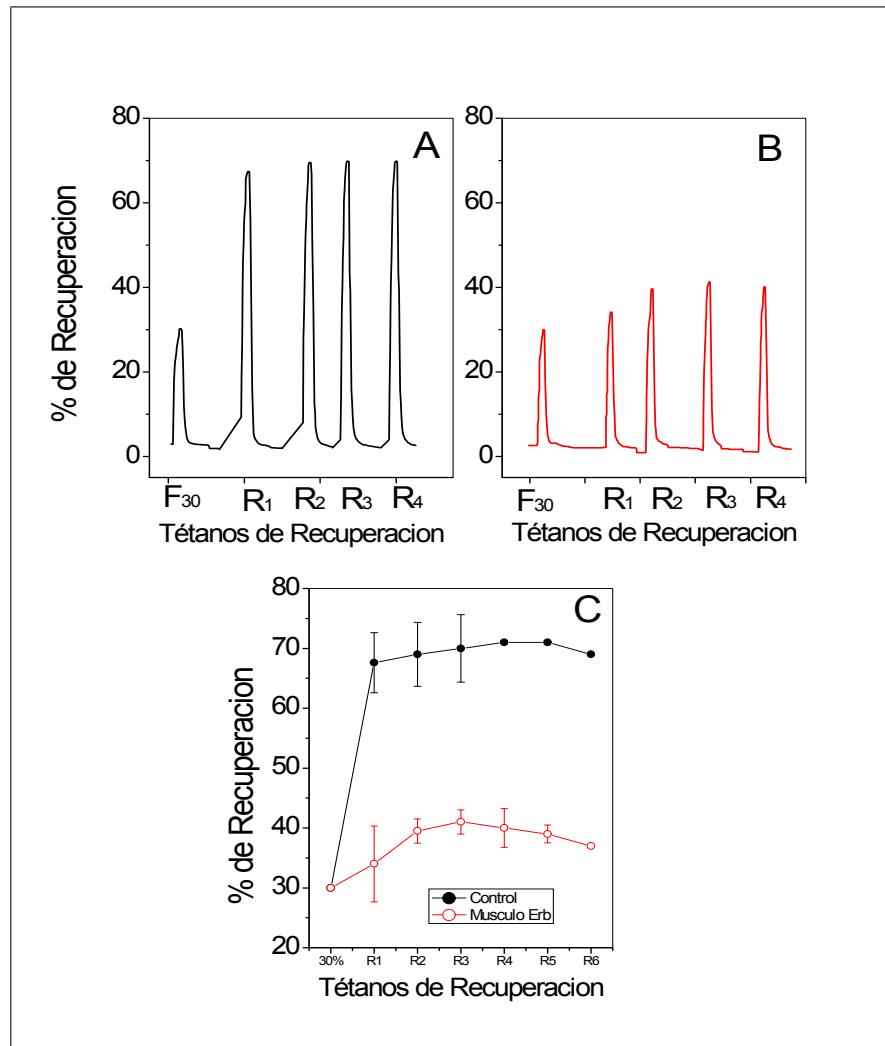


Figura 4-10: Recuperación del músculo *Sóleo*. A), B) Experimento representativo de recuperación para el caso control y para el músculo de *Erb*, respectivamente. C) Análisis estadístico (·) control y (○) Músculo de *Erb*.

4.3. Efectos del *L – Simendan* en las propiedades mecánicas del músculo rápido extensor *digitorum longus* – (*EDL*)

4.3.1. Efectos sobre la sacudida simple

En la Figura (4-11) se observa el desarrollo de fuerza generado por el músculo *EDL* a diferentes concentraciones, En el caso control se registra una contracción de 65 *mV* que se modifica ligeramente al incorporarle una dosis de 30 μM de *L – Simendan*, pero al duplicar la dosis sufre una disminución de la fuerza de contracción a 58 *mV* y la disminución continúa presentándose conforme se aumenta la concentración; a una dosis de 90 μM la contracción se reduce a 40 *mV*, y a partir de dosis más altas que ésta no se registran contracciones para sacudida simple.

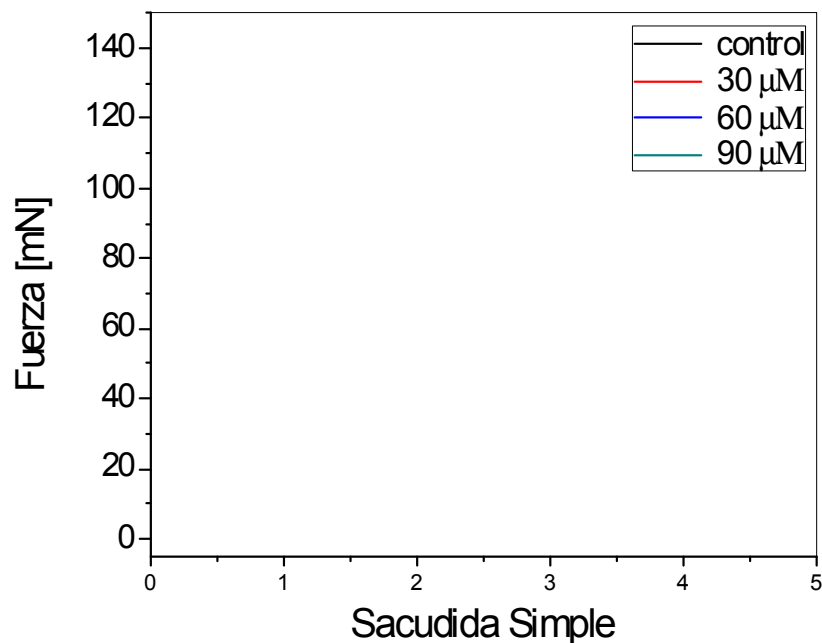


Figura 4-11: Sacudida Simple del *EDL* con 0, 30, 60 y 90 μM de *L – Simendan*.

El análisis estadístico se observa en la Figura (4-12). No hay una relación lineal en la pérdida de tensión en función de la concentración de *L – Simendan*. Una concentración de 30 μM de *L – Simendan* resulta en una pérdida de tensión del 5%, mientras que 60 μM disminuye la

tensión al 50%, con 90 μM de *L - Simendan* la tensión disminuye 70% y a concentraciones arriba de 90 μM se pierde la fuerza de contracción.

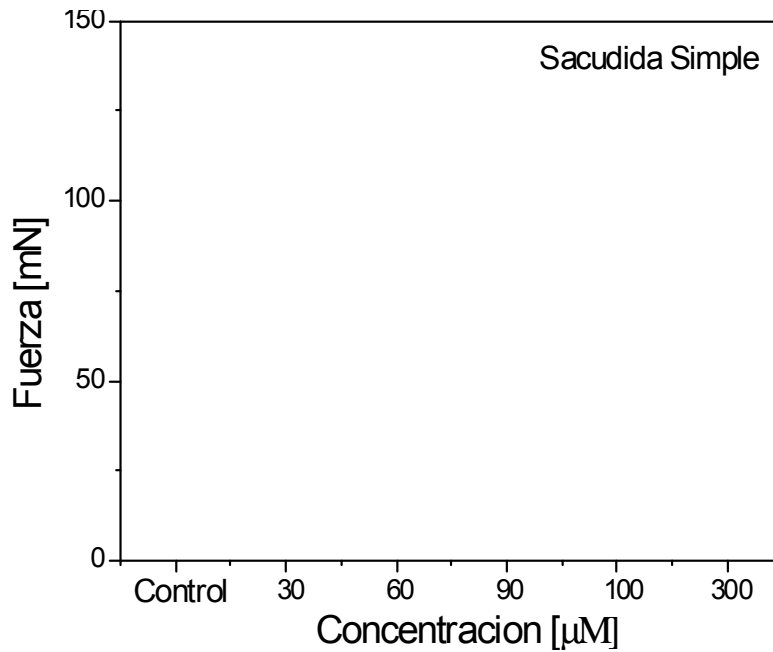


Figura 4-12: Contracción del músculo (*EDL*) a diferentes concentraciones de *L - Simendan* mediante el estímulo de sacudida simple.

4.3.2. Efectos sobre la fatiga

La fatiga en los músculos controles se aprecia como una disminución en la fuerza de contracción conforme se realiza la estimulación tetánica. El comportamiento presenta una tendencia lineal hasta el valor final de la fatiga (50 % respecto al tétanos inicial). La fuerza se pierde de manera proporcional hasta el 50% de la contracción inicial. La Figura (4-13) muestra la media estadística de los experimentos de fatiga.

Para las diferentes concentraciones en las que se usó el *L - Simendan* se obtuvo un decremento en la fuerza de contracción en el protocolo de fatiga respecto al caso control, y este decremento fue mayor al aumentar la concentración del fármaco. Concluyendo la fatiga al mismo tiempo tanto en las estimulaciones a concentración cero (caso control) como a las diferentes

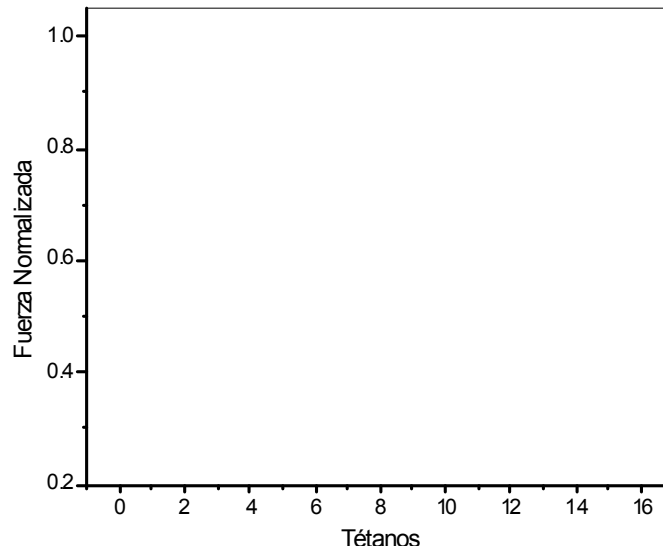


Figura 4-13: Fatiga de músculos controles.

concentraciones usadas. En la Figura (4-14) se muestra el comportamiento y la trayectoria de la fatiga del caso control y a las diferentes concentraciones.

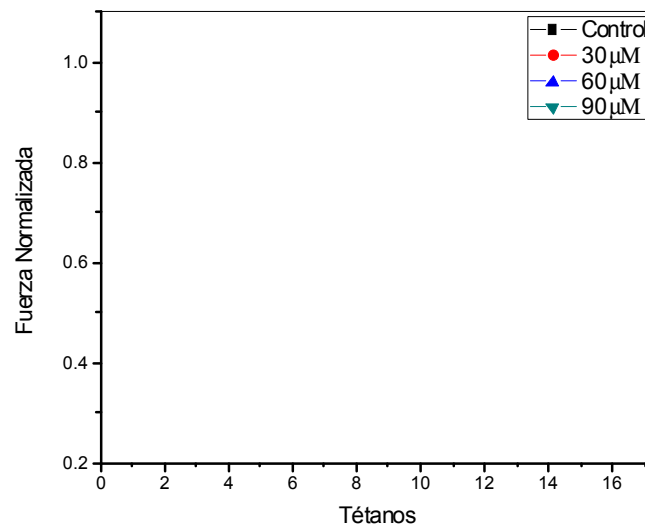


Figura 4-14: Fatiga control y a diferentes concentraciones.

4.3.3. Coeficiente de desvanecimiento (Fade)

Para la evaluación de los efectos del *L – Simendan* en la fatiga se usó la razón de desvanecimiento que proporciona información sobre la forma que presenta la parte superior de

la estimulación tetánica y está relacionada con el flujo de *calcio* existente entre el sarcoplasma y el retículo sarcoplásmico.

Para los músculos controles, durante la fatiga se aprecia un coeficiente de desvanecimiento menor que 1, lo que significa que la pendiente del tétanos presenta la misma forma: con pendiente negativa y este comportamiento se mantiene a lo largo de la estimulación tetánica como se muestra en la Figura (4-15).

El comportamiento del del coeficiente de desvanecimiento comienza con un valor promedio de 0,82 el cual tiende a decaer durante los siguientes tétanos y después a elevarse para mantenerse en un valor al cual se estabiliza en los periodos más intensos de fatiga.

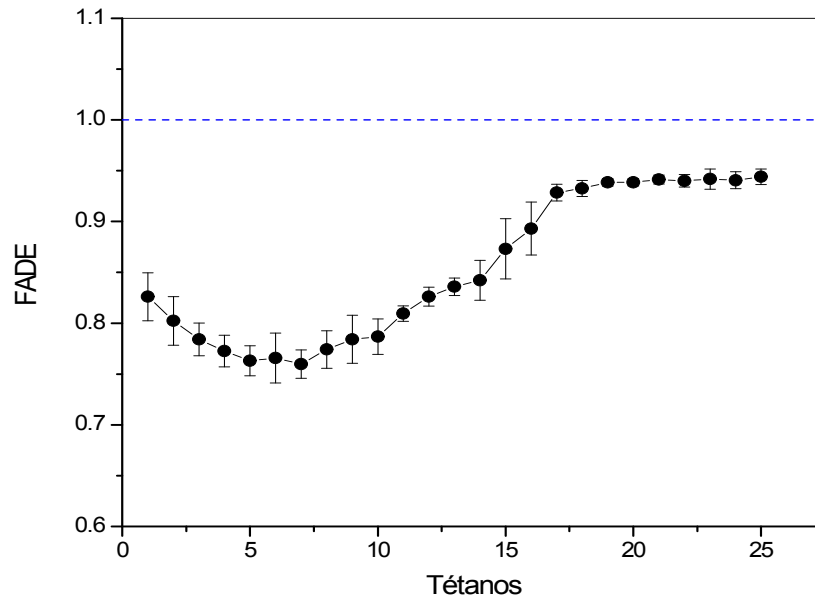


Figura 4-15: Coeficiente de desvanecimiento control.

El comportamiento del coeficiente de desvanecimiento en presencia de *L - Simendan* tiene un comportamiento parecido al control a la dosis más baja ($30\mu M$) durante la fase inicial de la estimulación, esto es, en los primeros tétanos; pero al ir prolongándose la estimulación, este coeficiente presenta un aumento en su valor indicando que la parte superior del tétanos se ha

modificado (Figura4-16). Los valores más cercanos a 1 indican que la terminación de la fase rápida de la respuesta al estímulo del músculo está muy cercana al punto al cual comienza la relajación. Para valores de fade mayores que 1, expresa que el punto en el que comienza la relajación está por encima del punto en el que termina la fase rápida de la estimulación, esto es, la pendiente de la parte superior del tétanos es positiva.

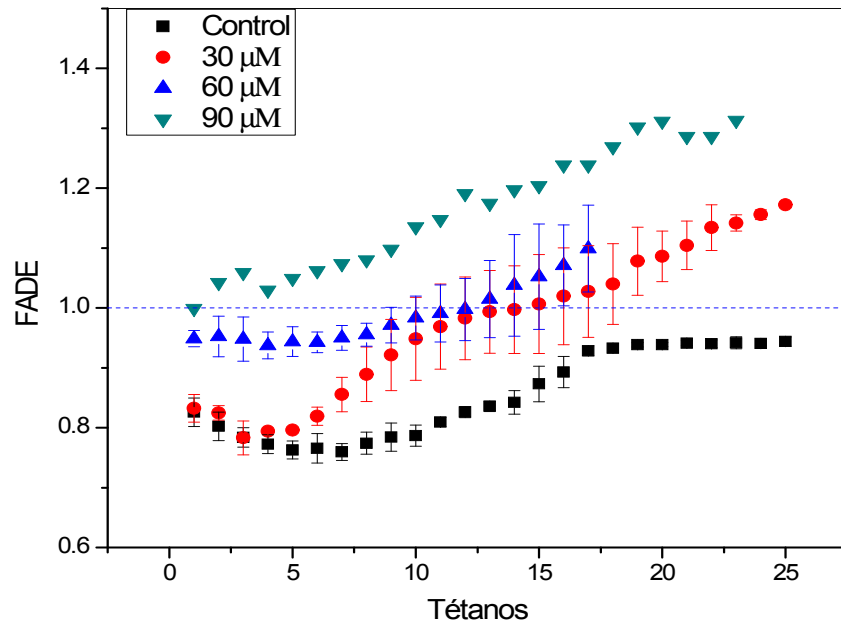


Figura 4-16: Comportamiento del coeficiente de desvanecimiento control y a diferentes dosis de *L - Simendan*.

Para visualizar el efecto del *L - simendan* en el tétanos durante la fatiga se hizo la siguiente gráfica (Figura4-17) en la que se observa la pérdida de fuerza de contracción es dependiente de la concentración.

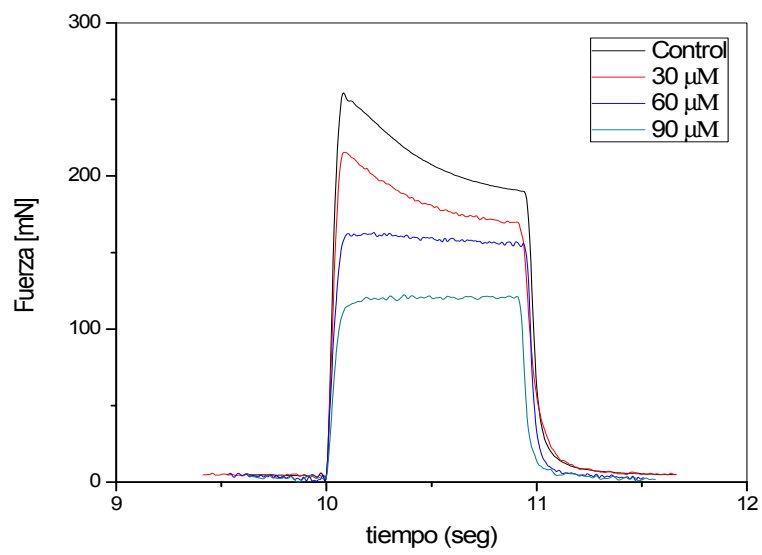


Figura 4-17: Tétano número 5 del protocolo de fatiga, control y a diferentes concentraciones de *L – Simendan*.

Capítulo 5

Discusión

El estudio de las propiedades mecánicas de las fibras musculares es fundamental en el entendimiento del efecto terapéutico de fármacos sobre la contractilidad de músculo y de las enfermedades del músculo esquelético que están relacionadas con alteraciones en la actividad muscular como miopatías y distrofias musculares (*DM*).

5.1. Propiedades mecánicas del músculo esquelético en presencia de un agente inotrópico terapéutico *L – Simendan*

Los agentes inotrópicos usados en la terapéutica médica están encaminados a potenciar la fuerza de contracción del músculo cardíaco[14], sin embargo, estos medicamentos operan sistémicamente, esto significa que pueden tener un efecto sobre otros tejidos que tengan a la molécula “blanco” para su acción. En este sentido, la molécula que se conoce con mayor afinidad por el *Simendan* es la *tropininaC*. Esta proteína tiene una alta afinidad por el *calcio*, lo que inicia la liberación de la *actina* para que pueda efectuarse la interacción *actina – miosina* y se lleve a cabo la contracción del músculo (propiedades mecánicas). El *L – Simendan* al unirse a la *tropininaC*, aumenta su afinidad por el *calcio* lo que resulta en mayor disponibilidad de la *actina* para formar el puente cruzado con la *miosina*[11] y de esta manera potenciar la fuerza de contracción (efecto inotrópico positivo).

En el músculo esquelético la maquinaria molecular que está involucrada en las propiedades mecánicas es la misma que en el músculo cardíaco, por lo que la *tropininaC* del músculo es-

quelético es el “blanco” del *L – Simendan*.

5.1.1. Efecto del *L – Simendan* sobre la sacudida simple (*SS*) del *EDL*

Se muestra un efecto inhibitorio de la fuerza de contracción lo que sugiere que hay menos disponibilidad del *calcio* en el *RS*, por lo que la salida de *calcio* del *SR* estimulada por un pulso eléctrico libera menos *calcio*, produciendo en consecuencia menos fuerza de contracción. Si el efecto del *L – Simendan* es sobre la afinidad al *calcio* por la *troponinaC*[20], esto explicaría una menor cinética de captura del *calcio* por la *SERCA* y por lo tanto menor concentración de *calcio* intravesicular. Sin embargo el efecto del *L – Simendan* sobre la *TroponinaC* resultaría en una contracción más sostenida, lo cual no se observa en la *SS*, esto indica que efecto que tiene *L – Simendan* sobre la fuerza de contracción en el músculo esquelético no resulta en un mayor acople entre *actina* y *miosina*, lo que sugiere a su vez un efecto inhibitorio de la *SERCA*, del receptor de *ryanodina* (canal de *calcio* del *RS*) o un efecto sobre otras proteínas parecidas a *troponinaC* como la *calmodulina*, que al ser estimuladas sirven como activadoras de las *PMCA* (*Plasma Membrane Calcium ATPases*) proteínas transportadoras de *calcio* de membrana plasmática, que sacan al *calcio* de la célula al exterior[47]. Si este es el caso, el resto de las propiedades mecánicas tienden a la inhibición de la fuerza de contracción, de forma inversa a lo que sucede con el músculo cardiaco.

5.1.2. Efecto del *L – Simendan* sobre la fatiga del *EDL*

Aunque la fatiga del músculo parece ser poco afectada de manera dosis dependiente hasta el 50% de la pérdida de tensión, el *EDL* se fatiga más rápido en presencia del *L–Simendan*, de tal manera que como se observa en la Figura (4-14), a los diez tétanos, a 90 μM de *L – Simendan* resultan en el doble de pérdida de tensión que el *EDL* control. La predisposición a la fatiga por el *L – Simendan* sugiere un efecto sobre la *SERCA*, el cual pudiera o no ser directo. A los 16 tétanos, Figura (4-14), tanto el *EDL* control como el *EDL* tratado con 90 μM de *L – Simendan* tienen la misma pérdida de tensión, lo que pudiera indicar un efecto de saturación del *L – Simendan* sobre su molécula “blanco”. Lo que resulta evidente es que el efecto inotrópico positivo del *L – Simendan* en el músculo esquelético no se observa como un aumento en la fuerza de contracción, por el contrario, inhibe las propiedades mecánicas, ya sean

a través de estimulaciones únicas o repetidas.

5.1.3. Efecto del *L – Simendan* sobre el coeficiente de desvanecimiento en la estimulación tetánica a los largo del protocolo de fatiga del *EDL*

Durante la fatiga (pérdida de tensión), estimulación tetánica y a lo largo de un tren de estimulaciones tetánicas en el músculo *EDL*, el coeficiente de desvanecimiento es < 1 . Esta es una característica del músculo rápido, contrario al músculo lento en donde el coeficiente de desvanecimiento es igual a 1, donde no se experimenta fatiga en las mismas condiciones de estimulación (voltaje, frecuencia y duración). Este decaimiento está dado por la actividad de la *SERCA*[42], ya que esta proteína regresa el *calcio* al *RS* de manera rápida provocando una menor disponibilidad de *calcio* en el aparato contráctil, específicamente de la *troponinaC* lo que resulta en una pérdida de tensión. El *L – Simendan* tiene un efecto inhibitorio sobre el coeficiente de desvanecimiento de manera dosis dependiente, de tal manera que con $90 \mu M$ de *L–Simendan* el coeficiente de desvanecimiento se modifica y la relación es > 1 . Este fenómeno se observa a diferente número de estimulaciones tétanicas, lo que implica que el proceso requiere de mayor tiempo de exposición para ejercer un efecto sobre la fuerza de contracción, involucrando a la concentración de *calcio* disponible en el citosol[11].

Es notable observar la Figura (4-17) que el único efecto inotrópico positivo encontrado en el músculo *EDL* por el *L – Simendan*, está sobre el coeficiente de desvanecimiento, lo que involucra directamente al *SR* y particularmente a la *SERCA1*.

5.1.4. Propiedades mecánicas del músculo esquelético en un modelo de distrofia muscular en murinos, distrofia muscular de *Erb*

Las *DM* están invariablemente asociadas con la mutación o ausencia de genes que codifican para proteínas ya sean del citoesqueleto subsarcolemal, proteínas costaméricas, proteínas sarcolemales y proteínas de la matriz extracelular[37][36]. La *DM* más común, es la distrofia muscular causada o por la ausencia de la distrofina (*DM* de *Duchenne*) o por mutaciones en el gen de la *distrofina* que resultan en la expresión de una proteína defectuosa (*DM* de *Becker*)[8]. Otras *DM* menos frecuentes o menos diagnosticadas son el resultado de ausencia del gen o mutaciones en el complejo *Sarcoglicano* (*SG*) que tiene una variedad de genotipos y

fenotipos importante, ya que el complejo esta formado por 5 proteínas diferentes[35].

La disminución de fuerza de contracción del músculo esquelético distrófico no es un fenómeno generalizado, el efecto sobre las propiedades contráctiles dependerá de la carencia de función de la proteína dañada o faltante en específico[35].

La carencia de $\delta - SG$ asociada con la carencia de $\gamma - SG$ y $\eta - Sarcospan$ [47] tienen como consecuencia una distrofia muscular progresiva que evoluciona hasta la edad adulta en el ratón y resulta en un daño muscular irreversible después de actividad muscular prolongada. En la presente tesis mostramos a esta *distrofia* como un ejemplo en donde la fuerza de contracción del músculo *EDL* y *Sóleo* se encuentra aumentada en comparación con su control sólo cuando la estimulación es tetánica.

5.1.5. Sacudida simple (*SS*) del *EDL* y *Sóleo* en la *DM* de *Erb*.

El hecho que durante la sacudida simple la tensión sea la misma sugiere que un solo estímulo umbral provoca la salida de *calcio* del *RS* necesaria para que se lleve a cabo el acople $e - c$ [11]. Durante la cinética de relajación se observa un cambio al final de la misma, siendo más rápida en el músculo distrófico *EDL* que el control, lo que sugiere que la actividad de la *SERCA* está aumentada. Por el contrario, en el *Sóleo*, se observó un aumento en la fuerza de contracción en la *SS*, y la cinética de relajación fue muy similar, encontrándose ligeramente disminuida en el músculo distrófico al final de la relajación. En el *Sóleo* no tan solo hay un aumento importante en la fuerza de contracción, también parece mantener la tensión por más tiempo, secundaria a un solo estímulo de la misma duración. La cinética de relajación es la misma a excepción del final de la relajación en donde es más lenta en el músculo distrófico. Durante la parte final de la relajación, en ambos tipos de músculo se presentan resultados inversos, siendo más rápida que en el control en el *EDL* y más lenta que el control en el *Sóleo*; lo que indica que la actividad de la *SERCA* como mecanismo de relajación, se encuentra afectado de distinta manera en el músculos rápido y lento[47].

5.1.6. Tétanos en el *EDL* y *Sóleo* en la *DM* de *Erb*

La estimulación tetánica, que provoca una contracción sostenida, se potencia tanto en el músculo *EDL* como en el *Sóleo*. En ambos casos no hay evidencia del fenómeno de fatiga, por

el contrario, a lo largo de tres estimulaciones tetánicas, no hay pérdida de tensión en el *EDL*, que es el músculo que normalmente se fatiga desde la primera estimulación tetánica [47] y sí ganancia de tensión. Esto indica que el mecanismo molecular involucrado en la fatiga, está directamente relacionado con la actividad de la *SERCA*, como ha sido sugerido previamente[47]. La tasa de desvanecimiento en cada una de las estimulaciones tetánicas para el *EDL* de *Erb* es positiva, lo que indica claramente un aumento en la disponibilidad del *calcio* en las miofibrillas para mantener la fuerza de contracción. Este *calcio* puede provenir del exterior de la fibra muscular, si la permeabilidad al *calcio* en la membrana plasmática está comprometida o puede provenir de los depósitos internos de *calcio*, específicamente el RS. Evidencias en RS aislado de músculo esquelético distrófico de *Erb* ($-/- \delta - SG$), demuestran que los *SG* son importantes para mantener la estructura y función de la *SERCA*, la ausencia de $\delta - SG$ desacopla la actividad de la *SERCA*, produciendo una salida pasiva de *calcio* importante del *RS*[47], lo que podría estar implicado en el aumento de fuerza en la estimulación tetánica.

5.1.7. Fatiga y Recuperación del *EDL* y *Sóleo* en la *DM* de *Erb*

El tren de estimulaciones tetánicas para conseguir una pérdida de tensión del 70%, relacionada al fenómeno de fatiga, implicaría una recuperación de la tensión después de un periodo de descanso, esto sucede en el caso de la fatiga en los músculos control. La pérdida de tensión al 30% ocurre en el mismo intervalo de tiempo para los músculos controles y distrófico, sean *EDL* o *Sóleo*. Sin embargo, la falta de recuperación de la tensión en los músculos distróficos indica que la pérdida de fuerza en éstos es el resultado de un daño celular y no corresponde al fenómeno fisiológico de fatiga.

Las propiedades mecánicas del músculo de *Erb*, una distrofia progresiva, es un ejemplo de un efecto inotrópico en el músculo esquelético aislado, que tiene como consecuencia un daño progresivo de la fibra muscular con una disminución en la transmisión de fuerza transversal, resultando en una pérdida de la sumatoria de fuerzas, lo que se visualiza como una pérdida de la fuerza total del músculo.

Capítulo 6

Conclusiones

6.1. Distrofia de Erb

Las distrofias musculares modifican la magnitud de la fuerza de contracción en el músculo esquelético en preparación isotónica en comparación al músculo sano. Como se trata de una patología en la que no se presenta una proteína asociada a la propagación de la energía mecánica de la fibra muscular hacia el exterior, se intuye que la fuerza de contracción será menor en el caso distrófico que en el caso control (músculo sano). Los resultados muestran que la fuerza de contracción es mayor en los músculos distróficos que en los músculos controles, tanto en los músculos preferentemente glucolíticos (fibras rápidas), como en los oxidativos (fibras lentas).

La distrofia afecta las propiedades mecánicas del músculo esquelético (a nivel contráctil) mediante alteraciones en el flujo de calcio entre el retículo sarcoplásmico y el sarcoplasma modificando de esta manera tanto la amplitud máxima de fuerza que puede desarrollar el músculo como la forma que presenta el comportamiento de la fuerza en relación al tiempo, esta última característica se manifiesta al analizar las gráficas del coeficiente de desvanecimiento donde se obtiene una inversión en la pendiente durante la estimulación tetánica.

Dentro del protocolo de estimulación donde se aprecian las diferencias entre las dos condiciones son en estimulación tetánica y fatiga; durante los tétanos se aprecia una disminución de la fuerza generada por el músculo en el caso control mientras que en el músculo de Erb la magnitud permanece inalterada. Durante la fatiga (estimulación tetánica sostenida) los músculos pierden

fuerza de manera gradual conforme se extiende el protocolo siguiendo la misma trayectoria y alcanzando el valor esperado de fatiga en tiempos similares, seguido de la fatiga, durante la recuperación, los músculos controles presentan una recuperación aceptable demostrando que la fatiga es un proceso fisiológico reversible, por otra parte, los músculos de Erb presentan una recuperación apenas perceptible por lo que prácticamente no hay recuperación en esta condición, indicando muerte celular.

6.2. L-Simendan

Los agentes inotrópicos orientados a aumentar el desempeño muscular cardiaco presentan efectos en los otros tipos de músculo (estriado y liso) debido a su distribución general después de la administración. Dado que los elementos contráctiles (sarcómeros) operan bajo el mismo mecanismo en los diferentes tipos de fibra muscular (cardiaca, lisa y estriada) se presentan efectos similares al incorporarse *L – simendan* al medio.

Se observó que para concentraciones bajas de *L – Simendan* no se presentan efectos sobre la sacudida simple y sobre la fatiga en el músculo rápido en preparación isotónica. Mientras la dosis se incrementa, el efecto que se presenta es la disminución de la fuerza de contracción en ambas estimulaciones hasta llegar a una concentración umbral donde no se registra contracción por lo que se propone que el flujo de *calcio* entre el retículo sarcoplásmico y el sarcoplasma es muy escaso o nulo debido a una baja disposición de éstos iones en el retículo sarcoplásmico o a una modificación de la bomba de potasio (*SERCA1*) que es la responsable del flujo de *calcio* entre las dos regiones en cuestión. Podría haber otro tipo de intercambio de iones de *calcio* entre el sarcoplasma con el medio extracelular mediante bombas de *calcio* ubicadas en el sarcolema modificando de esta manera la disponibilidad de iones de *calcio* necesarios para la contracción.

En la estimulación tetánica durante la fatiga, además de disminuir la fuerza de contracción de manera dependiente de la concentración, se presenta la inversión de la pendiente del coeficiente de desvanecimiento, este comportamiento también presenta una dependencia con la concentración a la que se usó el *L – Simendan* siendo mayores los cambios en el coeficiente de desvanecimiento para concentraciones mayores. El coeficiente de desvanecimiento relaciona la parte inicial del tétanos con la finalización del estímulo tetánico y describe la disponibilidad

del *calcio* durante la prolongación del tétano apoyando de esta manera nuestra justificación del flujo de *calcio*.

Bibliografía

- [1] Rumberger E. 2002. *Fisiología y teoría del entrenamiento*. Rev. Vol. 22, No. 3, pp 15-30
- [2] William F. Ganong.2000. *Fisiología medica*. Edit. Mac Graw-Hill. Madrid, España
- [3] José María Rosés, Casimiro Javierre. *Trabajo Muscular y Fatiga en el Ejercicio Físico*. Revisión. Volum 41, Número 150, Abril 2006
- [4] Antonio S. Frumento. *Biofísica*. Inter-médica editorial. Buenos Aires Argentina 1973.
- [5] Gary G. Matthews. *Cellular Physiology of Nerve and Muscle*. 4 ed. Blackwell Publishing Company 2006
- [6] Arthur C. Guyton y John E. Hall. *Tratado de Fisiología Medica*. 11 Ed. 2006
- [7] Leslie P. Gartner, James L. Hiatt. *Texto Atlas de Histología* 2a Edición McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. 2002
- [8] Jeffrey S. Chamberlain, Thomas A. Rando. *Duchenne Muscular Dystrophy, Advances in Therapeutics*. Taylor & Francis Group LLC. 2006
- [9] Vogel, S. Prime mover. *A natural history of muscle*.USA: W.W. Norton & Company; 2001
- [10] Tesis del biólogo Jesús Vega Moreno. *Comunicación de las proteínas del complejo Distrofina – Gliccoproteínas de la sarcolema en citoesqueleto en fibras musculares únicas durante la contracción*.
- [11] Huxley, A.F. *Muscle Structure and Theories of Contraction*. Prog. Bio-phys. Biophys. Chem. 1957; 7: 255 - 318

- [12] Freddy Antonio Pérez. *Modelo Biomécanico de la Generación de Fuerza Muscular en Condiciones Isométrica y Tetánica*. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, Junio, año/vol. 27, número 001. 2008
- [13] (WHO *Drug Information* Vol. 7, No. 3, 1993)
- [14] Sorsa, T., P. Pollesello and R. J. Solaro (2004). *The contractile apparatus as a target for drugs against heart failure: interaction of levosimendan, a calcium sensitiser, with cardiac troponin c*. Mol Cell Biochem 266(1-2): 87-107.
- [15] Haikala, H. and I. B. Linden (1995). *Mechanisms of action of calcium-sensitizing drugs*. J Cardiovasc Pharmacol 26 Suppl 1: S10-9.
- [16] Haikala, H., E. Nissinen, E. Etemadzadeh, J. Levijoki and I. B. Linden (1995). *Troponin C-mediated calcium sensitization induced by levosimendan does not impair relaxation*. J Cardiovasc Pharmacol 25(5): 794-801.
- [17] Lancaster, M. K. and S. J. Cook (1997). *The effects of levosimendan on $[Ca^{2+}]_i$ in guinea-pig isolated ventricular myocytes*. Eur J Pharmacol 339(1): 97-100
- [18] Hasenfuss, G., B. Pieske, M. Castell, B. Kretschmann, L. S. Maier and H. Just (1998). *Influence of the novel inotropic agent levosimendan on isometric tension and calcium cycling in failing human myocardium*. Circulation 98(20): 2141-7.
- [19] Janssen, P. M., N. Datz, O. Zeitz and G. Hasenfuss (2000). *Levosimendan improves diastolic and systolic function in failing human myocardium*. Eur J Pharmacol 404(1-2): 191-9.
- [20] Levijoki, J., P. Pollesello, P. Kaheinen and H. Haikala (2001). *Improved survival with simendan after experimental myocardial infarction in rats*. Eur J Pharmacol 419(2-3): 243-8.
- [21] Louhelainen, M., E. Vahtola, P. Kaheinen, H. Leskinen, S. Merasto, V. Kyto, P. Finckenberg, W. S. Colucci, J. Levijoki, P. Pollesello, H. Haikala and E. M. Mervaala (2007). *Effects of levosimendan on cardiac remodeling and cardiomyocyte apoptosis in hypertensive Dahl/Rapp rats*. Br J Pharmacol 150(7): 851-61.

- [22] Banfor, P. N., L. C. Preusser, T. J. Campbell, K. C. Marsh, J. S. Polakowski, G. A. Reinhart, B. F. Cox and R. M. Fryer (2008). Comparative effects of levosimendan, OR-1896, OR-1855, dobutamine, and milrinone on vascular resistance, indexes of cardiac function, and O₂ consumption in dogs. *Am J Physiol Heart CircPhysiol*294(1): H238-48.
- [23] Antila, S., S. Sundberg and L. A. Lehtonen (2007). Clinical pharmacology of levosimendan. *Clin Pharmacokinet*46(7): 535-52.
- [24] Levijoki, J., P. Pollesello, J. Kaivola, C. Tilgmann, T. Sorsa, A. Annala, I. Kilpelainen and H. Haikala (2000). *Further evidence for the cardiac troponin C mediated calcium sensitization by levosimendan: structure-response and binding analysis with analogs of levosimendan*. *J Mol Cell Cardiol*32(3): 479-91.
- [25] Antoniades, C., D. Tousoulis, N. Koumallos, K. Marinou and C. Stefanadis. *Levosimendan: beyond its simple inotropic effect in heart failure*, Pages 184-97, Copyright (2007)
- [26] Pataricza, J., J. Hohn, A. Petri, A. Balogh and J. G. Papp (2000). *Comparison of the vasorelaxing effect of cromakalim and the new inodilator, levosimendan, in human isolated portal vein*. *J Pharm Pharmacol*52(2): 213-7.
- [27] Grover, G. J. and K. D. Garlid (2000). *ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology*. *J Mol Cell Cardiol*32(4): 677-95.
- [28] O'Rourke, B. (2004). *Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection*. *Circ Res* 94(4): 420-32.
- [29] Kopustinskiene, D. M., P. Pollesello and N. E. Saris (2004). *Potassium-specific effects of levosimendan on heart mitochondria*. *Biochem Pharmacol*68(5): 807-12.
- [30] Kersten, J. R., M. W. Montgomery, P. S. Pagel and D. C. Warltier (2000). *Levosimendan, a new positive inotropic drug, decreases myocardial infarct size via activation of K(ATP) channels*. *Anesth Analg*90(1): 5-11.
- [31] Kaptan, K., K. Erinc, A. Ifran, V. Yildirim, M. Uzun, C. Beyan and E. Isik (2008). *Levosimendan has an inhibitory effect on platelet function*. *Am J Hematol*83(1): 46-9.

- [32] Sareila, O., R. Korhonen, H. Auvinen, M. Hamalainen, H. Kankaanranta, E. Nissinen and E. Moilanen (2008). *Effects of levo- and dextrosimendan on NF – kappaB – mediated transcription, iNOS expression and NO production in response to inflammatory stimuli.* Br J Pharmacol 155(6): 884-95.
- [33] Bushby KM, Beckmann JS. *The 105th ENMC sponsored workshop: pathogenesis in the nonsarcoglycan limb-girdle muscular dystrophies*, Naarden, April 12-14, 2002. Neuro-muscDisord 13:80-90, 2003
- [34] Pogue R, Jackson T, Sayli B, Curtis A, Bushby KM. *Limb-girdle muscular dystrophy or spinal muscular atrophy: a source of diagnostic confusion?* J Med Genet. 1997 Nov;34(11):958-9.
- [35] Lim LE, Campbell KP. *The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy.* Curr Opin Neurol. 1998 Oct.; 11(5):443-52.
- [36] Dalkilic I, Kunkel LM. *Muscular dystrophies: genes to pathogenesis.* Curr Opin Genet Dev. 2003 Jun;13(3):231-8.
- [37] Bushby KM. *The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms.* Hum Mol Genet. 1999; 8(10):1875-82.
- [38] Comerlato EA, Scola RH, Werneck LC. *Limb-girdle muscular dystrophy: an immunohistochemical diagnostic approach.* Arq Neuropsiquiatr. 2005 Jun;63(2A):235-45.
- [39] Ervasti M, Penttilä K, Siltari S, Delezuch W, Punnonen K. *Diagnostic, Clinical and laboratory turnaround times in troponin T testing.* Clin Chem Lab Med. 2008;46(7):1030-2.
- [40] McNally EM, Passos-Bueno MR, Bönnemann CG, Vainzof M, de Sá Moreira E, Lidov HG, Othmane KB, Denton PH, Vance JM, Zatz M, Kunkel LM. *Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation.* Am J Hum Genet. 1996 Nov;59(5):1040-7.
- [41] Ueda H, Ueda K, Baba T, Ohno S. *Delta- and gamma-Sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle.* J Histochem Cytochem. 2001 Apr;49(4):529-38.

- [42] Estrada FJ, Mornet D, Rosas-Vargas H, Angulo A, Hernández M, Becker V, Rendón A, Ramos-Kuri M, Coral-Vázquez RM. *A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Feb 17;340(3):865-71. Epub 2005 Dec 27.
- [43] Solares G, Herranz JL, Sanz MD. *Suxamethonium-induced cardiac arrest as an initial manifestation of Duchenne muscular dystrophy*. *Br J Anaesth*. 1986 May;58(5):576.
- [44] Nigro V, Okazaki Y, Belsito A, Piluso G, Matsuda Y, Politano L, Nigro G, Ventura C, Abbondanza C, Molinari AM, Acampora D, Nishimura M, Hayashizaki Y, Puca GA. *Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene*. *Hum Mol Genet*. 1997 Apr;6(4):601-7.
- [45] Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM. *Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin*. *J Cell Biol*. 1998 Sep 7;142(5):1279-87.
- [46] Hack AA, Cordier L, Shoturma DI, Lam MY, Sweeney HL, McNally EM. *Muscle degeneration without mechanical injury in sarcoglycan deficiency*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10723-8.
- [47] Solares-Pérez A, Alvarez R, Crosbie RH, Vega-Moreno J, Medina-Monares J, Estrada FJ, Ortega A, Coral-Vazquez R. *Altered calcium pump and secondary deficiency of gamma-sarcoglycan and microspan in sarcoplasmic reticulum membranes isolated from delta-sarcoglycan knockout mice*. *Cell Calcium*. 2010 Jul;48(1):28-36. Epub 2010 Jul 16.