



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

*“Los efectos del Carazolol sobre las propiedades
mecánicas del músculo esquelético”.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

Eduardo Rodríguez Correa

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Alicia Ortega Aguilar.

MIEMBRO DE COMITÉ TUTORAL: Dr. Adolfo García Sainz

MIEMBRO DE COMITÉ TUTORAL: Dr. Fidel Ramón Romero

MIEMBRO DE COMITÉ TUTORAL: Dr. Alejandro Zentella Dehesa

MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mi madre por todo su apoyo, sin el cual no habría llegado tan lejos

A mi padre por su grande interés en mi desarrollo

A Karime por su cariño que me hizo sonreír durante todo el proceso

A todos aquellos profesores y tutores que dedicaron su tiempo a que este trabajo fuera mejor cada vez

A Rocío, que estuvo ahí siempre para ayudarme con cada experimento

A Ricardo ya que sin su ayuda el análisis de datos hubiera sido un desastre

A Jo que me brindó muchas herramientas para que este trabajo fuera más sencillo

A Francisco quien ayudó con su crítica constructiva durante cada seminario

A Aura quien me ayudó a conseguir muchos artículos, entre otras cosas

Al doctor José María Farías por enseñarme a aislar y a trabajar con los músculos

A Alicia por brindarme los medios y el apoyo para lograrlo

A todos los demás compañeros del laboratorio que hicieron algo por mí o que simplemente estuvieron ahí para amenizar el proceso

Contenido

ABREVIATURAS	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 MÚSCULO ESQUELÉTICO	8
1.1.1 <i>Componentes extracelulares</i>	9
Figura 1.1 Estructura de la unión neuromuscular.....	10
1.1.2 <i>Sarcolema</i>	10
Figura 1.2 Estructura de la triada.....	11
Figura 1.3 Proteínas encargadas de la transmisión de fuerza lateral.....	12
1.1.3 <i>Miofibrillas</i>	13
Figura 1.4 Estructura de las miofibrillas.....	14
Figura 1.5 Estructura del sarcómero.....	15
1.1.4 <i>Mecanismos moleculares de la contracción</i>	15
Figura 1.6 Componentes de los filamentos gruesos.....	16
Figura 1.7 Componentes de los filamentos delgados.....	17
1.1.4 <i>Acoplamiento excitación-contracción</i>	17
Figura 1.8 Pasos moleculares que promueven la contracción muscular.....	19
1.1.5 <i>Regulación del proceso de contracción mediado por Ca²⁺</i>	20
Figura 1.9 Mecanismos de regulación de SERCA.....	23
1.1.6 <i>Deslizamiento de las proteínas contráctiles</i>	23
Figura 1.10 Pasos moleculares para el deslizamiento de las proteínas contráctiles.....	25
1.1.6 <i>Metabolismo muscular</i>	26
Figura 1.11. Sistemas para la obtención de ATP del músculo esquelético.....	27
1.1.7 <i>Tipos de fibras musculares</i>	28
Figura 1.12. Registro de fuerza representativo de un músculo rápido y uno lento.....	30
Cuadro 1. Propiedades de los tipos de fibras musculares.....	31
1.2 COMUNICACIÓN ENTRE EL SISTEMA NERVIOSO Y EL MÚSCULO	31
1.2.1 <i>Mecanismos regulatorios de la contracción muscular</i>	32
Figura 1.13 Mecanismos de inervación del músculo esquelético.....	33
1.2.2 <i>Sistema Nervioso Parasimpático</i>	34
1.2.3 <i>Sistema Nervioso Simpático</i>	34
1.3 SISTEMA ADRENÉRGICO	35
1.3.1 <i>Mecanismo de acción de los adrenoceptores</i>	36
Figura 1.14 Transducción de la señal de un adrenoceptor.....	37
Cuadro 2. Subtipos de adrenoceptores, sus proteínas G y sus efectos en diferentes tejidos.....	38
1.3.2 <i>Receptores adrenérgicos β_3</i>	39
Cuadro 3. Efectos de algunos agonistas de los receptores adrenérgicos tipo β_3	41
1.4 CARAZOLOL	41
1.4.1 <i>Fórmula</i>	42
Figura 1.15 Fórmula química del Carazolol.....	42
1.4.2 <i>Efectos del Carazolol sobre el músculo esquelético</i>	43
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
2.1 OBJETIVO	45
2.2 HIPÓTESIS	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1 ANIMALES	46
3.1.1 <i>Ratas</i>	46

Figura. 2.1 Rata Wistar.....	46
3.2 FÁRMACOS Y SOLUCIONES	47
3.2.1 <i>Solución Krebs</i>	47
Cuadro 2.1 Componentes y proporciones de la solución Krebs.....	47
3.2.2 <i>Carazolol</i>	48
Cuadro 2.2 Concentraciones de Carazolol utilizadas.....	48
3.3 AISLAMIENTO DE LOS MÚSCULOS	48
Figura. 2.2 Localización del EDL y Soleus en humano y en la rata.....	49
Figura 2.3. Microscopio y material quirúrgico utilizados.....	50
Figura. 2.4 Nudos realizados en los tendones.	50
3.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	51
Figura. 2.5 Músculo aislado y sujetado dentro de la cámara de estimulación.....	51
Figura. 2.6 Estimulador, osciloscopio, transductor, fuente de poder y amplificador	51
3.4.1 <i>Protocolo de estimulación</i>	52
Figura 2.8 Esquema representativo del protocolo de estimulación.....	54
3.4.2. <i>Análisis de resultados y pruebas estadísticas</i>	54
4. RESULTADOS.....	55
4.1 MÚSCULO EDL	55
4.1.1 <i>Curva de concentración-respuesta EDL</i>	55
Figura 3.1. Curva concentración-respuesta sobre la fatiga del músculo EDL.....	56
4.1.2 <i>Fatiga EDL</i>	57
Figura 3.2. Efecto del Carazolol 30µM sobre la fatiga del músculo EDL	57
4.1.3 <i>Recuperación EDL</i>	58
Figura 3.3. Fuerza de recuperación del músculo EDL.....	58
4.1.4 <i>Desvanecimiento EDL</i>	59
Figura 3.4. Efecto del Carazolol sobre el desvanecimiento del músculo EDL.....	59
4.2 MÚSCULO SOLEUS	60
4.2.1 <i>Curva de concentración-respuesta del Soleus</i>	60
Figura 3.5. Curva dosis-respuesta sobre la fatiga del músculo Soleus.....	60
4.2.2 <i>Fatiga Soleus</i>	61
Figura 3.6. Efecto del Carazolol 30µM sobre la fatiga del músculo Soleus.	61
4.2.3 <i>Recuperación del Soleus</i>	61
Figura 3.7. Fuerza de recuperación del músculo Soleus.....	62
4.2.4 <i>Desvanecimiento del Soleus</i>	62
Figura 3.8. Efecto del Carazolol sobre el desvanecimiento del músculo Soleus.	63
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	63
5.1 FATIGA.....	64
5.2 MÚSCULO EDL	66
5.2.1 <i>Recuperación EDL</i>	66
5.2.2 <i>Desvanecimiento EDL</i>	67
Figura 4.1 Proteínas responsables de la forma del tétanos.....	68
5.3 MÚSCULO SOLEUS	69
5.3.1 <i>Recuperación del músculo Soleus</i>	69
5.3.2 <i>Desvanecimiento músculo Soleus</i>	70
6. CONCLUSIONES.....	70
REFERENCIAS	72

Abreviaturas

- μM = Micromolar
- AC = Adenilil ciclasa
- AcC = Acetilcolina
- ADP = Adenosín difosfato
- AMP = Adenosín monofosfato
- ATP = Adenosín trifosfato
- Ca^{2+} = Ion calcio
- CT = Cisterna terminal
- DHPR = Receptor a dihidropiridina
- EDL = *Extensor digitorum longus*
- FADH = Flavín adenín dinucleótido
- GDP = Guanosín difosfato
- GTP = Guanosín trifosfato
- G_{α} = Subunidad alfa de la proteína G
- G_{β} = Subunidad beta de la proteína G
- G_{γ} = Subunidad gamma de la proteína G
- K^{+} = Ion potasio
- Na^{+} = Ion sodio
- NADH = Nicotidamina adenina dinucleótido
- nm = nanómetros
- ON = Óxido nítrico
- P_i = Fosfato inorgánico
- PLN = Fosfolamban
- RS = Retículo sarcoplásmico
- RyR = Receptor a rianodina
- SERCA = ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico
- SN = Sistema nervioso
- SNC = Sistema nervioso central
- SNP = Sistema nervioso periférico
- SNPs = Sistema nervioso parasimpático
- SNS = Sistema nervioso simpático
- UNAM = Universidad Nacional Autónoma de México

Resumen

El *Carazolol* es un fármaco que tiene un potente efecto bloqueador de los receptores β -adrenérgicos 1 y 2 y es agonista de los receptores β -adrenérgicos tipo 3. Este fármaco es utilizado importantemente en la industria de la producción animal para la obtención de carne (músculo) magra destinada al consumo humano y en el dopaje de caballos atletas de alto rendimiento durante el entrenamiento para fortalecer su desempeño muscular. No existen evidencias experimentales que sugieran el mecanismo de acción de este fármaco en el músculo esquelético. En este trabajo se estudió el efecto agudo que tiene el *Carazolol* sobre las propiedades mecánicas de los dos tipos de músculo: el músculo esquelético de contracción rápida (*Extensor digitorum longus* o EDL) y en el músculo esquelético de contracción lenta (*Soleus*). El *Carazolol* disminuye la fuerza de contracción de manera dosis dependiente en ambos tipos de músculo potenciando la fatiga. Con respecto a la recuperación de los músculos, el *Carazolol* no fue capaz de llevar la fuerza al estado inicial; sin embargo, ambos los músculos EDL tratados con *Carazolol* recuperaron mayor fuerza con respecto a la pérdida durante el protocolo de fatiga que los músculos control; en el caso del *Soleus* este recuperó la misma cantidad de la fuerza perdida que el músculo control. El efecto del *Carazolol* sobre la pérdida de tensión en el tétanos del músculo EDL sugiere un efecto sobre la actividad de la SERCA₁, proteína encargada de la recaptura de calcio en el retículo sarcoplásmico y la relajación muscular. Este efecto no se observa en el músculo lento, lo que sugiere un efecto sobre las proteínas responsables de regular la actividad de la isoforma SERCA₁ del músculo de contracción rápida y no sobre SERCA₂, presente en el músculo de contracción lenta. Esta regulación puede estar mediada por la activación de Sarcalumenina y no de Fosfolamban. Es importante resaltar la fatiga del músculo *Soleus* inducida por *Carazolol* ya que el fármaco puede ser usado como una herramienta para el estudio del mecanismo molecular de la fatiga muscular, el que actualmente se desconoce.

Abstract

Impermeable drug *Carazolol* has a potent blocking effect on β 1 and 2 adrenergic receptors and an agonist effect on β 3 type adrenergic receptors. It's mainly used to improve quality of meat consumed by humans and also to improve the muscular performance of athletic horses. At the moment there is no evidence showing the action mechanism that this drug has in skeletal muscle. In this work the effect produced by *Carazolol* under the mechanical properties of two types of fibers was studied: fast contraction skeletal muscle (EDL) and slow contraction skeletal muscle (*Soleus*). *Carazolol* was found to reduce contraction force in a dose-depending manner increasing fatigue in both types of skeletal muscles. Muscles incubated with this drug, at a $30\mu\text{M}$ concentration did not recover initial force after fatigue protocol; however when recovery force was compared with force lost during fatigue protocol, EDL muscle had higher contraction force when compared to Control one; and *Soleus* muscle recovery force was the same as the Control one. The effect on the *Tetani* shape produced by EDL muscle suggests that *Carazolol* may be modulating SERCA1 activity, as this protein manages the intake of ionic calcium which produces muscle relaxation. This effect cannot be seen on *Soleus* muscle which suggests that *Carazolol* may be acting on SERCA 1 via its regulatory proteins. This effect seems to be SERCA1 specific, suggesting activation of Sarcalumenin or another similar protein in fast contraction muscles; and not PLN which regulate SERCA2 activity in slow contraction muscles. It is also important to remark the increase in *Soleus* muscle fatigue as this drug could be used to further investigate the molecular mechanisms of fatigue which is still unclear.

1. Introducción

1.1 *Músculo esquelético*

El músculo esquelético de los vertebrados representa entre el 40 y el 50 por ciento de su peso corporal (Lefaucheur *et al.* 2002). Este sistema lleva a cabo movimientos como los que permiten mantener la ventilación pulmonar, los necesarios para realizar movimientos precisos y coordinados al escribir o hasta los necesarios para huir de una presa; por lo cual este sistema es de vital importancia.

El músculo esquelético se forma en el embrión a partir de células del mesodermo lateral que se fusionan de manera longitudinal y transversal dando origen a una célula multinucleada llamada fibra muscular. Cada fibra muscular se encuentra rodeada por una capa de tejido conectivo y matriz extracelular, llamado *endomisio* que la conecta de manera transversal a otras fibras. Varias fibras musculares dan lugar a un *fascículo*, que a su vez se encuentra rodeado de otro tejido conectivo llamado *perimisio*. Los fascículos se organizan para formar músculos completos; el tejido conectivo o fascia que rodea a los músculos recibe el nombre de *epimisio* (Ashmore y Doerr 1971). Los fascículos son inervados por una o más motoneuronas dependiendo de la función específica de dicho músculo. Los músculos que se mueven con mucha precisión, como los músculos de las manos, reciben mayor comunicación neuronal que aquellos que no se mueven con tanta precisión, como los músculos de la espalda o aquellos que mueven las piernas.

La principal función de los músculos esqueléticos es la de contraerse para generar *fuerza* y/o *acortamiento*, lo que puede o no generar movimiento.

Existen dos tipos generales de contracción:

- *Contracción isométrica*. En este tipo de contracción, el músculo no se acorta aunque está generando *fuerza*. Un ejemplo de esta contracción es cuando se mantiene levantada una pesa con el brazo; el músculo está generando fuerza para no dejar caer la pesa pero no a través del acortamiento, ya que no hay ningún tipo de movimiento.
- *Contracción isotónica*. En este tipo de contracción el músculo genera una *fuerza* que se traduce en *acortamiento o movimiento*. En el ejemplo anterior la contracción isotónica se llevaría a cabo si la pesa levantada fuera cambiada de posición gracias al movimiento del músculo.

Es importante resaltar que las contracciones fisiológicas normalmente se componen de una mezcla de contracciones isométricas e isotónicas, generando momentos de acortamiento seguidos de momentos de tensión sin acortamiento, o viceversa.

El movimiento puede suceder gracias a que los músculos están unidos a los huesos por medio de estructuras fibrilares de colágena denominadas *tendones*.

Los componentes moleculares del músculo, responsables de lograr la fuerza de contracción se describen a continuación.

1.1.1 Componentes extracelulares

Fuera de la célula muscular existe una estructura tripartita denominada *unión neuromuscular*. Esta estructura se forma por el botón sináptico de una motoneurona que

contiene vesículas lipídicas llenas del neurotransmisor *acetilcolina* (AcC). Cuando el cerebro envía una señal eferente, se genera la despolarización de la membrana neuronal, lo que lleva a un potencial de acción y la liberación del Calcio iónico (Ca^{2+}) que se encuentra almacenado en el retículo endoplásmico. Este Ca^{2+} induce la fusión de las vesículas y la liberación de AcC al espacio sináptico por medio de la exocitosis (Figura 1.1) (Widmaier *et al.* 2001)

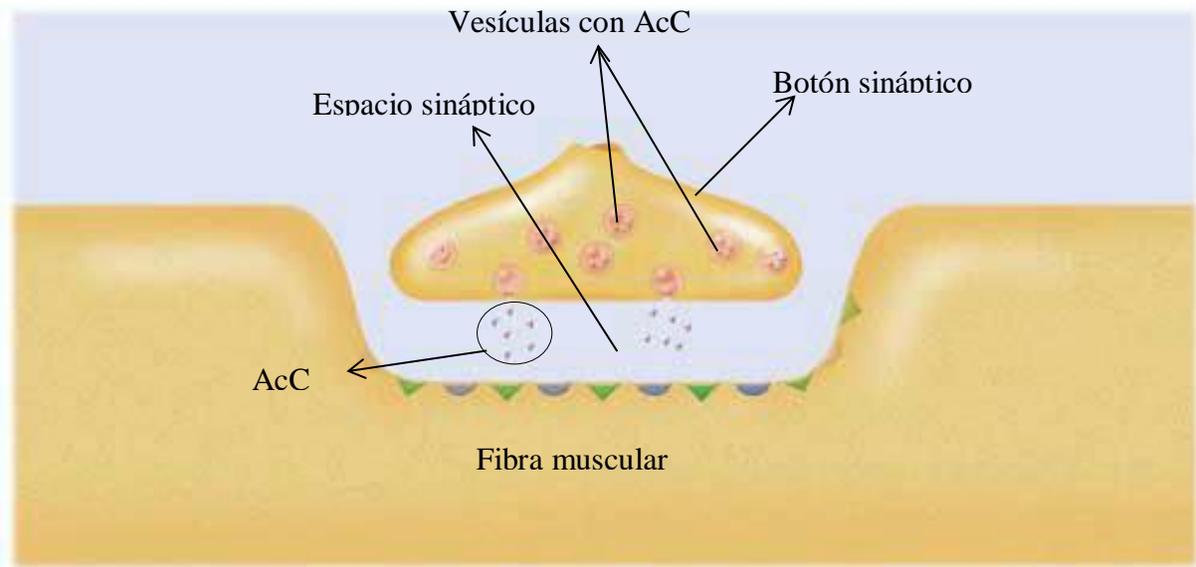


Figura 1.1 Estructura de la unión neuromuscular. (Modificada de Widmaier *et al.* 2001)

1.1.2 Sarcolema

La membrana que compone una fibra muscular se conoce como sarcolema. La sarcolema no es uniforme como en la mayoría de las células del organismo, tiene invaginaciones que van hasta el interior de la fibra muscular (denominadas *túbulos transversos*) que se asocian con extensiones del retículo sarcoplásmico (denominadas *cisternas terminales*) y

forman la denominada *triada* (Figura 1.2). Estas triadas tienen gran relevancia en el proceso de contracción como veremos más adelante.

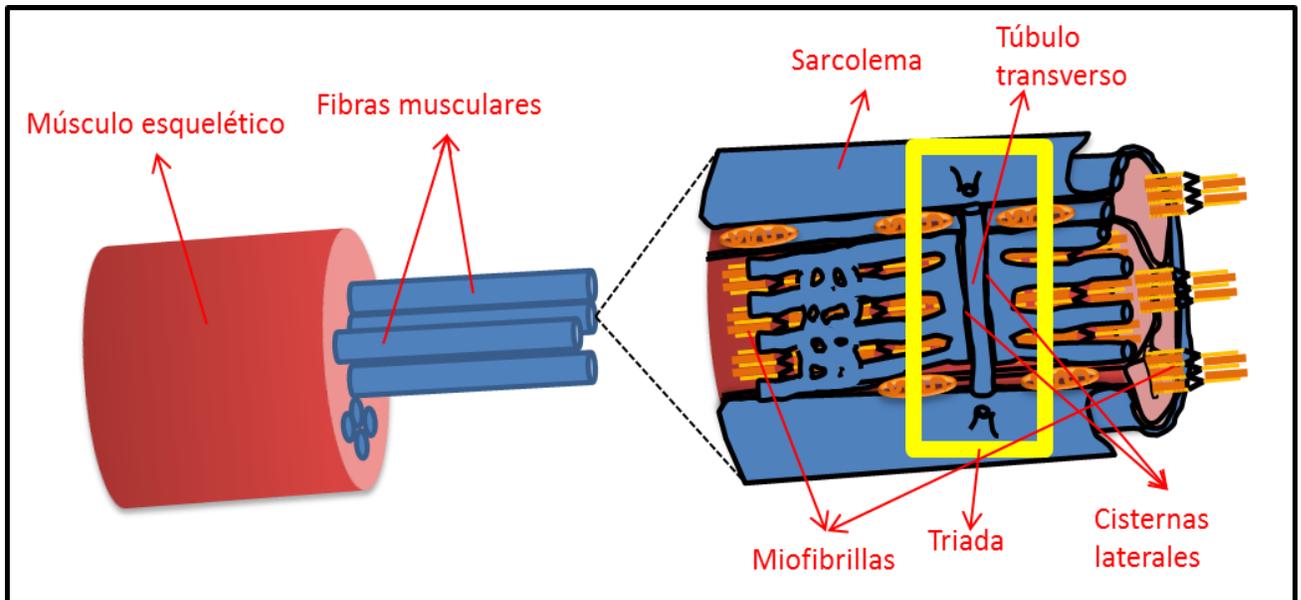


Figura 1.2 Estructura de la triada.

Como todas las membranas biológicas, la sarcolema se compone de una bicapa fosfolipídica en cuya estructura se insertan proteínas transmembranales u otras que se asocian únicamente en la parte interna o externa de la membrana. La distribución lipídica y proteica de la sarcolema no es homogénea, de hecho, forma dominios discretos enriquecidos en esfingolípidos y colesterol, donde se encuentran importantes proteínas relacionadas con la comunicación entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (Vega-Moreno, *et al* 2012).

La sarcolema también contiene gran cantidad de glicoproteínas que se extienden hasta unirse con la matriz extracelular. Algunas de estas glicoproteínas, junto con la matriz extracelular, ayudan a la fibra muscular en contracción a transmitir la fuerza a las fibras adyacentes; este proceso se denomina: *transmisión de la fuerza lateral*.

Entre las proteínas membranales o extramembranales implicadas en este proceso se encuentran los *sarcoglicanos*, el *distroglicano* y la *laminina*; mientras que en la parte intracelular participa la *distrofina* que se une directamente a la maquinaria contráctil (García-Pelagio KP, *et al* 2011) (Figura 1.3).

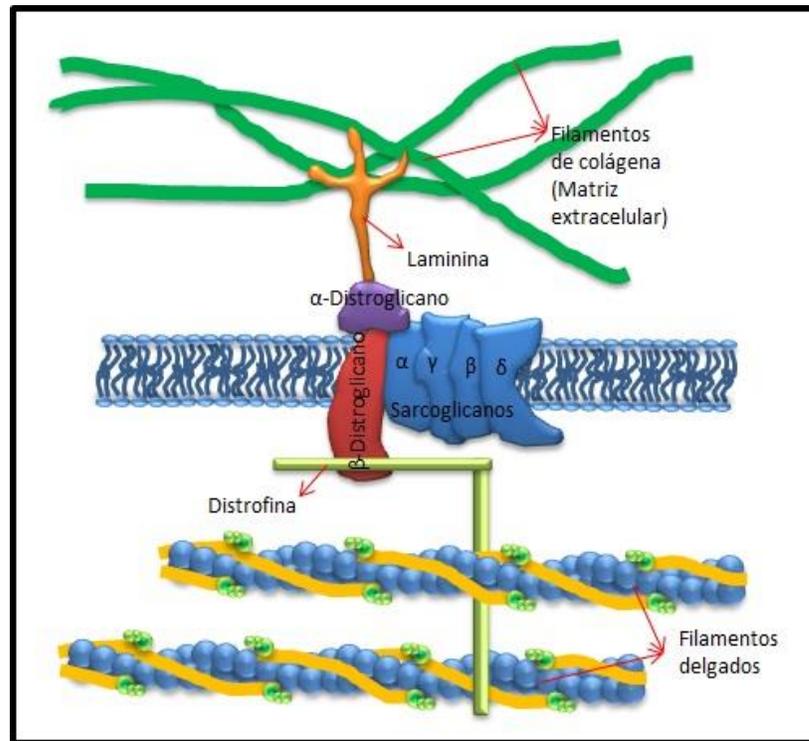


Figura 1.3 *Proteínas encargadas de la transmisión de fuerza lateral.*

La unión de las fibras musculares a la matriz extracelular (epimisio) les permite estar ancladas a las demás fibras musculares, por lo que al contraerse, una fibra es capaz de provocar la contracción de las adyacentes gracias a la fuerza mecánica que la primera ejerce sobre las demás.

Otras proteínas importantes de la sarcolema son los receptores de AcC y los canales involucrados en la biomecánica de la contracción, que se describirán más adelante.

1.1.3 Miofibrillas

Cuando observamos un músculo esquelético a través de un microscopio óptico encontramos una serie de bandas oscuras y claras perpendiculares al eje longitudinal de la fibra. Estas bandas permitieron describir la morfometría de las fibras musculares y gracias a ellas, al tejido que contiene dicho patrón de bandeo, se le conoce como *músculo estriado*.

Esta estriación resulta de cúmulos proteicos en arreglos cilíndricos en el citoplasma (sarcoplasma) que dan lugar a filamentos gruesos y filamentos delgados: *las miofibrillas*.

Estas miofibrillas abarcan entre el 75 y el 90 por ciento de la masa del músculo esquelético y abarcan la región comprendida entre los tendones que limitan al músculo (Lefaucheur et al. 2002).

Cuando se describió al músculo por primera vez se describieron varios tipos de bandas una A, denominada por su capacidad *anisotrópica* de desviar la luz polarizada, una I, por su capacidad *isotrópica*; y una Z (de la palabra en alemán entre "zwischen"). A la región comprendida entre dos líneas Z se denominó *sarcómero* (Figura 1.4).

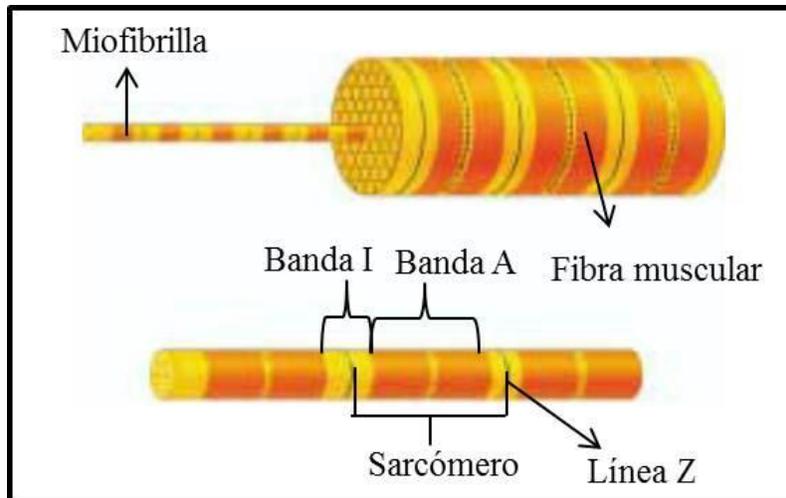


Figura 1.4 Estructura de las miofibrillas.
(Modificada de Widmaier et al. 2001)

Los filamentos gruesos y delgados se repiten de manera sarcomérica, es decir con un patrón definido a lo largo de toda la fibra.

Los filamentos gruesos están compuestos, casi exclusivamente de la proteína contráctil miosina; mientras que los filamentos delgados contienen a la proteína f-actina y también al complejo proteico regulador del calcio: la troponina (C, I y T) y la tropomiosina.

Los filamentos gruesos se arreglan en la zona intermedia del sarcómero intercalándose con los filamentos delgados en la zona que corresponde a la banda A. Al final de ésta los filamentos delgados se conectan con una proteína perpendicular al eje longitudinal de la fibra, que se pliega en forma de zigzag, *la línea Z*.

A la mitad del sarcómero existe una región en la que sólo existen filamentos gruesos; a esta región se le conoce como *la banda H* (de la palabra en alemán hell, que significa "clara" o "brillante") (Figura 1.5).

En la región correspondiente a la *banda I*, además de los filamentos delgados unidos a las proteínas de la banda Z, se encuentra la proteína *Titina* muy importante para el acortamiento y estiramiento pasivo del sarcómero.

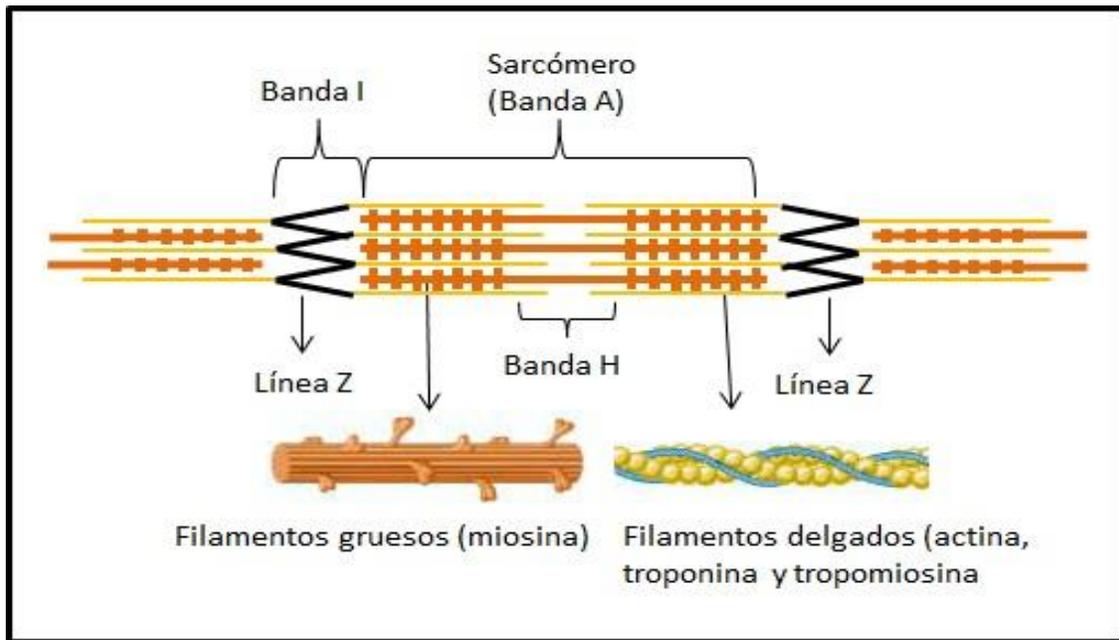


Figura 1.5 Estructura del sarcómero (Modificada de Widmaier *et al.* 2001)

Los filamentos delgados y los gruesos se unen entre sí por medio de los puentes cruzados que se describen en seguida.

1.1.4 Mecanismos moleculares de la contracción

Los *filamentos gruesos* se componen de 2 cadenas largas de miosina pesadas y cuatro cadenas ligeras más cortas. Estas moléculas forman una estructura que tiene una cabeza doble (compuesta por las cuatro *cadena ligeras* y las dos pesadas) y una cadena larga trenzada (formada únicamente por las dos *cadena pesadas*) (Figura 1.6). La cabeza de esta molécula contiene dos sitios de unión: uno para actina y el otro para Adenosín

trifosfato (ATP); el sitio de unión del ATP también sirve como una enzima ATPasa que hidroliza esta molécula.

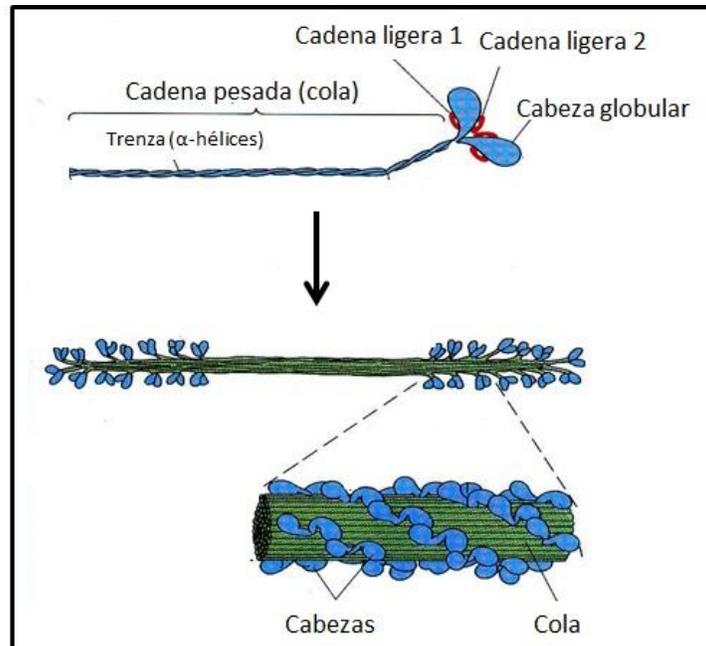


Figura 1.6 Componentes de los filamentos gruesos.
(Tomada de <http://cbe.ivic.ve/LBEfolleto.html>)

Por otra parte, los *filamentos delgados* se componen de moléculas de *actina* globulares (G-actina); esta cadena se entrelaza con otra para formar una doble hélice. Cada 7 moléculas de actina en el polímero de f-actina, contiene un sitio de unión para *miosina* que se encuentra cubierto por una proteína alargada: *la tropomiosina*. Unida a la tropomiosina se encuentra la subunidad T y ésta a su vez se encuentra unida a las subunidades C e I de la *troponina* (Figura 1.7).

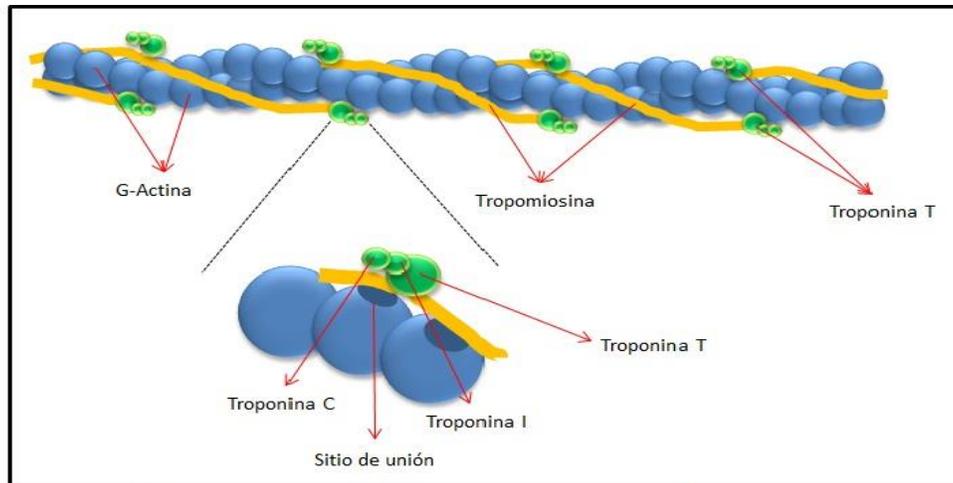


Figura 1.7 Componentes de los filamentos delgados.

En la contracción isométrica los filamentos delgados y gruesos inician contacto de manera calcio dependiente, formando los *puentes cruzados* para interactuar con la miosina. El sitio activo de la actina se libera cuando se desplaza el contacto actina-tropomiosina, ésta depende de la liberación de la interacción de la tropomiosina con la troponina T, que a su vez depende de la interacción de la troponina T con las troponinas I (inhibitoria) y la troponina C (fijadora de calcio). De no liberarse a la tropomiosina, no puede haber interacción actina-miosina y por lo tanto no se desplazarán ni generarán fuerza, provocando que el músculo no se contraiga.

1.1.4 Acoplamiento excitación-contracción

Desde el momento en el que el neurotransmisor AcC se une a su receptor en la célula muscular comienza el proceso de excitación por medio de la despolarización de la membrana celular.

El acoplamiento entre la excitación y la contracción muscular es el mecanismo mediante el cual se acopla la despolarización de la sarcolema con la contracción muscular. Este proceso depende de un gran número de proteínas y de pasos que se describen a continuación.

1. El receptor para AcC es un canal de Sodio (Na^+) que se abre cuando se le une una molécula de AcC. Este receptor, al dejar entrar Na^+ , estimula la apertura de los canales de Na^+ sensibles a voltaje que se distribuyen a lo largo de toda la sarcolema. La entrada del ion sodio inicia la despolarización de la sarcolema (a este fenómeno se le conoce como excitación de la célula muscular).
2. La despolarización de la sarcolema se propaga a través de los túbulos transversos hasta llegar a la región de la triada.
3. En la tríada la despolarización de la membrana promueve el cambio de configuración del receptor a dihidropiridina (DHPR), que es un canal de Calcio lento, dependiente de voltaje.
4. El cambio conformacional del DHPR, a su vez, induce una interacción proteína-proteína con el receptor para rianodina (RyR) que es un canal de Calcio en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) localizado principalmente en la cisterna terminal (CT).
5. La activación de RyR por medio de la interacción con DHPR, abre el canal y se libera el Ca^{2+} (contenido en el retículo sarcoplásmico que está a una concentración milimolar) al citoplasma.

6. Los iones de Ca^{2+} liberados se unen a troponina C y de esta manera se libera la tropomiosina de la actina, dejando libres los sitios activos de las proteínas encargadas del proceso de deslizamiento de los filamentos.
7. Cuando comienza el proceso de relajación, la *ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico* (SERCA, por sus siglas en inglés) hidroliza ATP y utiliza la energía para regresar el Ca^{2+} sarcoplásmico al RS, lo que promueve que la troponina C nuevamente quede libre para interactuar a través de la troponina T con la tropomiosina y esta última inhibir nuevamente los sitios de la actina para unirse a la molécula de miosina. Por lo tanto la proteína SERCA es la responsable de la relajación muscular (Figura 1.8).

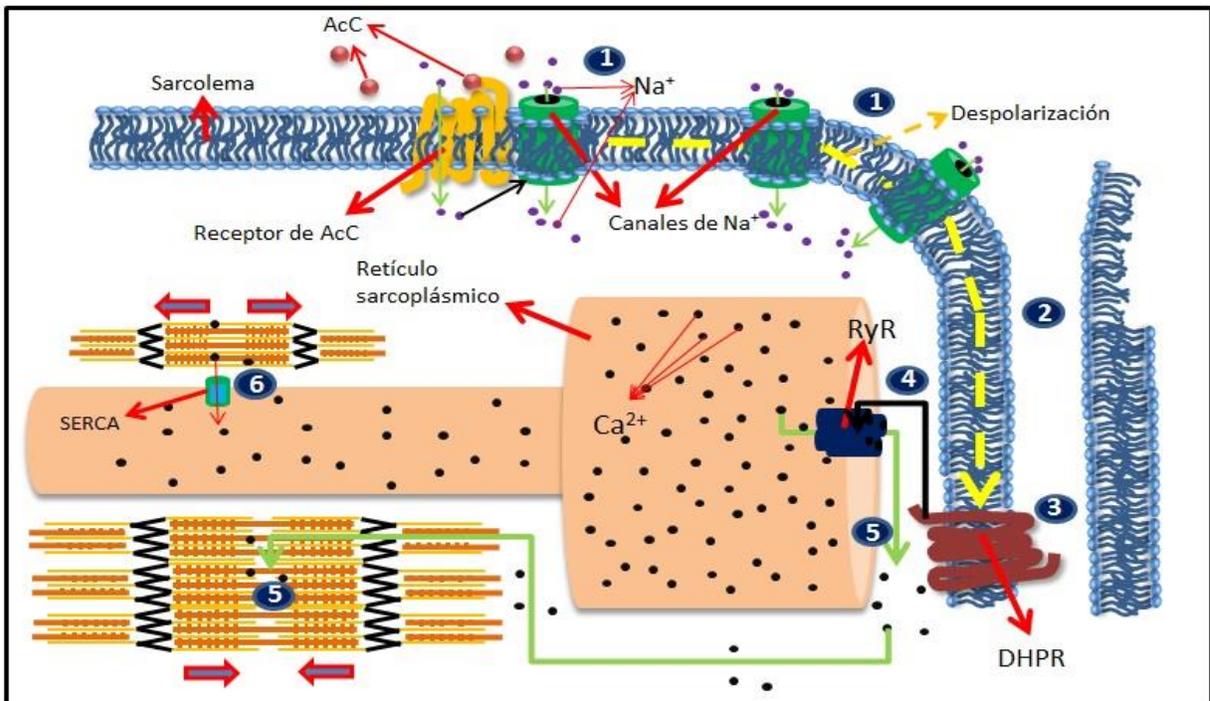


Figura 1.8 Pasos moleculares que promueven la contracción muscular.

Para regular este proceso de contracción-relajación existen diversas proteínas que modulan de manera directa o indirecta el flujo del ion calcio en la célula muscular,

1.1.5 Regulación del proceso de contracción mediado por Ca^{2+}

Debido a la gran importancia que tiene el Ca^{2+} en la contracción muscular existen diversas proteínas involucradas en regular las concentraciones y el flujo de este ion dentro y a través de los compartimentos celulares (Rossie E. 2006 & Zarain-Herzberg A 2006). Estas proteínas pueden ser agrupadas, de acuerdo a su función, de la siguiente manera:

- Proteínas encargadas del almacenamiento de Ca^{2+}

El RS es el principal organelo encargado del almacenamiento de este ion en músculo estriado. En su interior se encuentran proteínas que unen a este ion y, de esta manera mantienen la concentración de Ca^{2+} libre del RS alrededor de 1mM .

Dentro de estas proteínas la más importante se conoce como Calsecuestrina que compone el 27% de estas proteínas y se encarga de unir a la mayoría del Ca^{2+} libre. Esta proteína se localiza principalmente en la CT del RS gracias a interacciones con RyR, Triadina y Junctina (Costello B. 1986 & Zhang L. 1997).

Gracias a la interacción que existe entre la Calsecuestrina, Triadina, Junctina y RyR el efecto tamponante del Ca^{2+} se da en las regiones cercanas a los lugares de liberación de esta molécula, en donde colocaliza con los canales RyR.

- Proteínas encargadas de la liberación del Ca^{2+}

Las principales proteínas encargadas de la liberación del Ca^{2+} al citoplasma son los canales conocidos como RyR. Estos canales se encuentran en mayor concentración en la membrana de la CT y se encuentran unidos a los canales de Ca^{2+} DHPR, de esta manera cuando el potencial de acción modifica la estructura de DHPR, éste es capaz de inducir

cambios conformacionales en RyR, provocando la liberación del Ca^{2+} lo que induce la contracción.

Los canales de DHPR pueden ser considerados los últimos reguladores de la liberación de Ca^{2+} ; al haber un potencial de acción, los canales RyR serán activados de manera completa y por lo tanto habrá liberación máxima de calcio. Cuando aparece otro potencial de acción subsecuente al primero se dará una menor liberación de Ca^{2+} mediada por la inactivación de DHPR por el calcio citoplásmico. De esta manera la inactivación de DHPR asegura que no se terminará el Ca^{2+} existente en el RS.

Otras moléculas solubles y proteínas asociadas pueden actuar directamente sobre los canales de liberación de Ca^{2+} regulando la liberación de dicho ion y por lo tanto los procesos de contracción-relajación (Mg^{2+} , ATP, Ca^{2+} , especies reactivas de oxígeno, FKBP₁₂, Calmodulina, Homer y PKA).

- Proteínas encargadas de la reabsorción de Ca^{2+}

Para que el músculo deje de generar una fuerza, se requiere de la reabsorción del Calcio al RS, este proceso está mediado por la proteína SERCA. Esta proteína contiene 5 isoformas principales codificadas en por 3 diferentes genes y se expresan de manera diferencial en los diferentes tejidos: la isoforma SERCA₁ (codificada por el gen *ATP2A1*) se encuentra en las fibras musculares de contracción rápida. Los últimos dos exones de este gen sufren de splicing alternativo y nos dan como resultado las isoformas SERCA_{1a} y SERCA_{1b} que se expresan en células musculares de contracción rápida adultas y neonatales, respectivamente.

La isoforma SERCA2 también sufre de splicing alternativo y nos produce dos isoformas: SERCA2a y SERCA2b. SERCA2a se encuentra en fibras musculares de contracción lenta adultas, neonatas y en músculo cardiaco. SERCA2b se encuentra expresada en músculo liso y células no musculares.

El funcionamiento de esta proteína varía ligeramente de acuerdo a la isoforma expresada; de la misma manera, la actividad de SERCA es regulada por diversas proteínas y factores de manera fibra específica.

En cuanto a la isoforma SERCA1 se ha encontrado que coprecipita junto con una proteína de 21 aminoácidos denominada Sarcolipina (MacLennan DH 1972). Se ha demostrado que esta proteína inhibe la actividad de SERCA1 al disminuir su afinidad por el Ca^{2+} disminuyendo su V_{max} (Odermatt A. 1998). SERCA1 también es inhibida por óxido nítrico (ON) y su afinidad por el Ca^{2+} disminuye cuando el pH disminuye (Ishii T. 1998). Adicionalmente la actividad de SERCA1 puede ser regulada positivamente por la proteína de unión a Ca^{2+} Sarcalumenina que incrementa su estabilidad y reduce su degradación (Yoshida M. 2005) (Figura 1.9 panel a).

En cuanto a la isoforma SERCA2 encontramos otra proteína con alta homología de secuencia con Sarcolipina que se denomina Fosfolamban (PLN) que tiene un efecto inhibitorio sobre SERCA2 disminuyendo su afinidad por el Ca^{2+} y su V_{max} (Kirchberger MA. 1974 & Tada M, 1974). Esta proteína se encuentra normalmente unida a SERCA2 ejerciendo su efecto inhibitorio sobre ésta. En músculo cardiaco la activación de los receptores del sistema beta adrenérgico induce la activación de la adenilato ciclasa (AC), que a su vez activa a la proteína PKA que cataliza la fosforilación de PLN haciendo que se

separe de SERCA2, por lo tanto aumentando su V_{max} (Brittsan AG 2000, MacLennan DH 2003 & Tada M. 2003) (Figura 1.9 panel b).

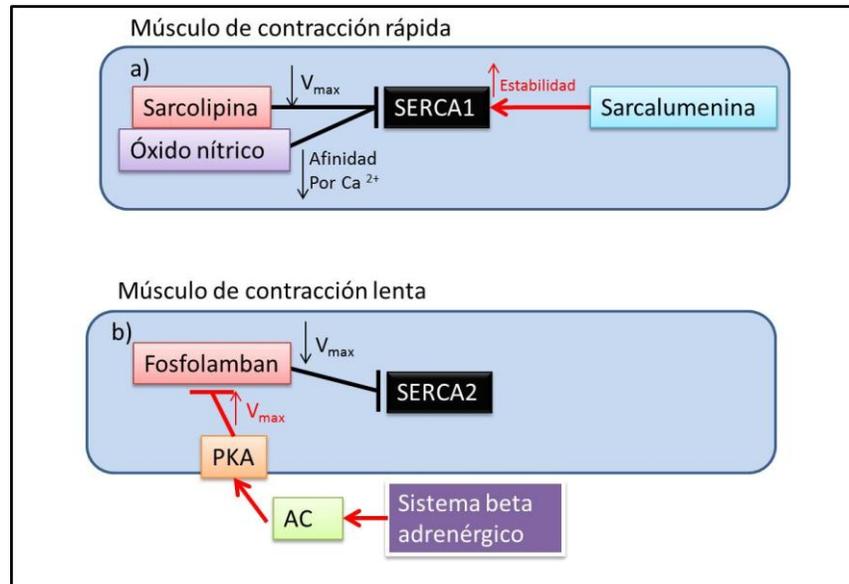


Figura 1.9 Mecanismos de regulación de SERCA. A) En el músculo de contracción rápida tanto la Sarcolipina como el óxido nítrico inhiben a SERCA1 disminuyendo su afinidad por el Ca^{2+} y por lo tanto su V_{max} . La Sarcalumenina aumenta la estabilidad de SERCA1 aumentando su eficiencia. B) En el músculo de contracción lenta Fosfolamban se encuentra unido a SERCA2 disminuyendo su V_{max} . Cuando se activa el sistema Beta adrenérgico se activa a la AC que incrementa los niveles de AMPc que activan a PKA; esta proteína fosforila a Fosfolamban induciendo su separación de SERCA2 y por lo tanto activándola e incrementando su V_{max} .

1.1.6 Deslizamiento de las proteínas contráctiles

Las *proteínas contráctiles* generan fuerza al deslizarse entre sí, ya sea acortando la distancia que separa los extremos de la fibra o simplemente generando tensión entre estos extremos.

Para que este proceso contráctil se lleve a cabo es necesaria la presencia de dos moléculas muy importantes: el ion Ca^{2+} y el ATP.

Cuando el Ca^{2+} se libera del RS difunde a través del sarcoplasma y se une a las proteínas de la maquinaria contráctil que se deslizan entre sí siguiendo los siguientes pasos:

1. Unión del Ca^{2+} al complejo proteínico de la troponina (específicamente a la troponina C), que promueve cambios conformacionales en las proteínas del complejo, los que dejan libre a la tropomiosina ocasionando que se desplace hacia un lado y deje libre el sitio de unión para miosina. La cabeza de la cadena de miosina hidroliza el ATP formando Adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i).
2. Se desplaza la cabeza de miosina hacia adelante aproximadamente 5 nm. Este proceso es ATP dependiente, pero sin hidrólisis.
3. Se forman los *puentes cruzados* entre la cabeza de la miosina y el sitio activo de la actina.
4. El ADP junto con el P_i son liberados de la cabeza de miosina y la proteína vuelve a su forma original, regresando las cadenas de actina y miosina a su posición original.
5. Cuando se une una nueva molécula de ATP a la cabeza de miosina se rompe el puente cruzado y las proteínas vuelven a su forma original. El proceso de relajación, es dependiente de la hidrólisis de ATP (Figura 1.10).

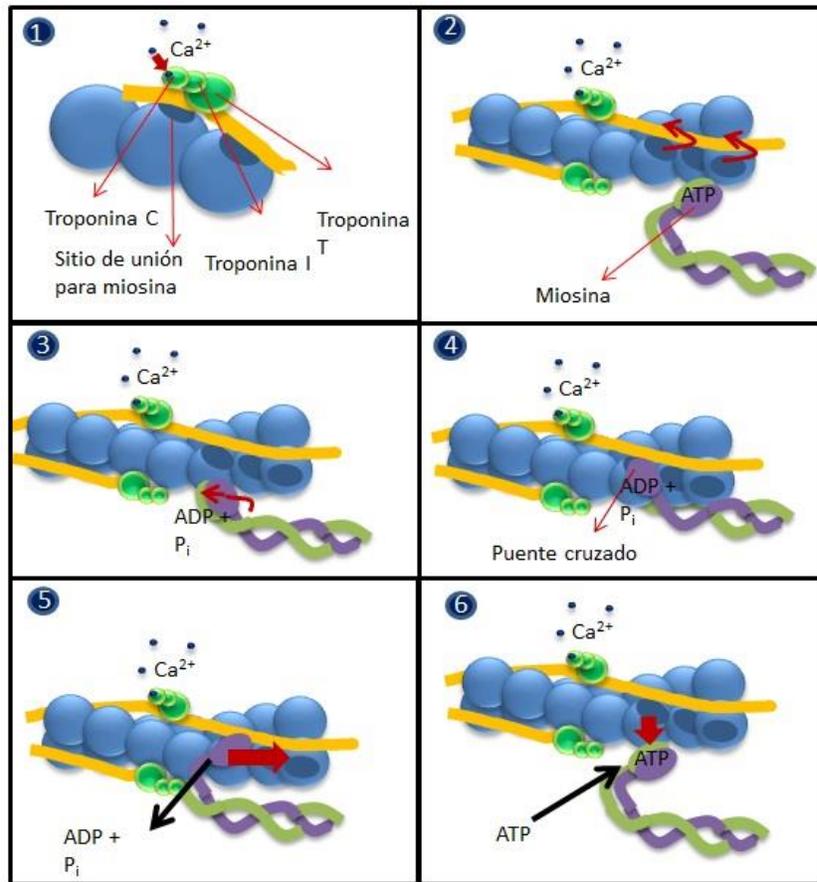


Figura 1.10 Pasos moleculares para el deslizamiento de las proteínas contráctiles

Al haber muchas moléculas tanto de actina como de miosina, el desplazamiento de las miofibrillas genera un movimiento similar al de un cierre, que se conoce como *mecanismo de cremallera*; este mecanismo de cremallera es el responsable de generar la *fuerza mecánica* característica de la contracción muscular.

Cando la proteína SERCA ha regresado el Ca^{2+} al RS la tropomiosina vuelve a ocultar los sitios activos de la actina, promoviendo la *relajación muscular*.

1.1.6 Metabolismo muscular

El músculo esquelético requiere de grandes cantidades de ATP para llevar a cabo los procesos implicados en la contracción muscular y la relajación. Entre los que consumen mayor cantidad de energía se encuentran:

- Desplazamiento de las cabezas de miosina sobre las fibras de actina (mecanismo de puentes cruzados-cremallera).
- Recuperación del Ca^{2+} sarcoplásmico por medio de la ATPasa de Ca^{2+} SERCA.
- La membrana muscular debe mantener un potencial de membrana electronegativo con respecto a su entorno, para lograr este potencial la bomba *ATPasa de Na^+ y Potasio (K^+)* utiliza ATP para intercambiar estos iones con el medio externo y así, mantener las concentraciones ideales de estos iones.

Debido a la gran demanda de ATP que generan estos mecanismos existen 3 principales maneras de almacenar o proveer al músculo de esta molécula energética:

1. Sistema *fosfocreatina-creatina*.- En este sistema el músculo esquelético almacena energía en moléculas de fosfocreatina. Al terminarse las reservas de ATP el músculo es capaz de tomar la energía de esta molécula hidrolizando su último fosfato y liberando creatina al medio (Figura 1.11 panel A).
2. Sistema *glucógeno-ácido láctico*.- Otra manera de almacenar energía es la de consumir las reservas de glucógeno transformándolas a glucosa, para posteriormente enviarlas al ciclo del ácido láctico. Este mecanismo produce 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Figura 1.11 panel B).

3. Sistema *aeróbico*.- Durante el sistema aeróbico el músculo es capaz de quemar glucosa, ácidos grasos y aminoácidos por medio de los mecanismos específicos para cada molécula para producir Acetil coenzima A y posteriormente introducirlos al *metabolismo aeróbico* o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura 1.11 panel C).

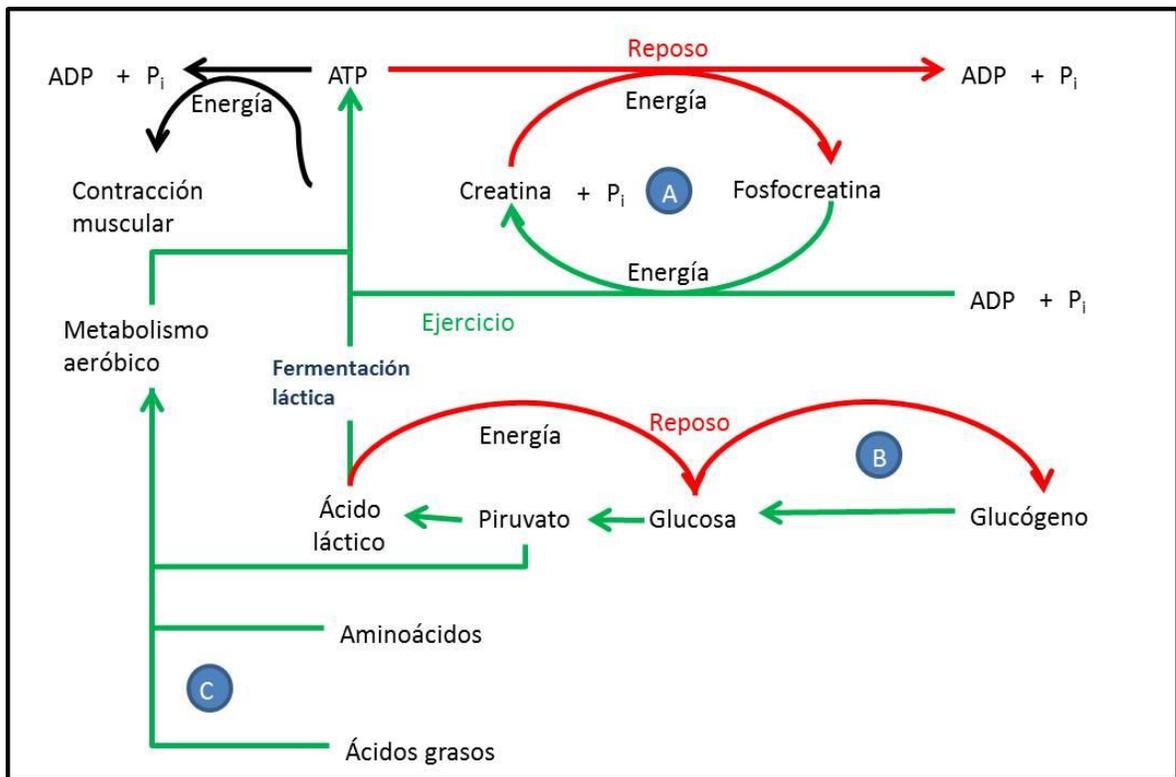


Figura 1.11. Sistemas para la obtención de ATP del músculo esquelético.

Habiendo descrito los sistemas metabólicos y los mecanismos de la contracción muscular, cabe mencionar que existen 2 tipos de fibras musculares que se caracterizan por diferentes tipos de contracción y diferentes metabolismos.

1.1.7 Tipos de fibras musculares

Los dos tipos generales de fibras musculares responden a dos esfuerzos físicos: el de respuesta rápida y potente y el de respuesta prolongada e infatigable.

Durante el desarrollo ontogénico del músculo los miocitos dan lugar a dos tipos generales de fibras musculares: *las fibras de contracción lenta* y *las fibras de contracción rápida*, que se denominan de esta manera gracias a la velocidad de reacción que presentan para contraerse. Sin embargo, estos tipos de fibras musculares difieren en más aspectos que en su velocidad de contracción.

Todo músculo se compone de una mezcla de ambos tipos de fibras dependiendo de su función. Aquellos músculos encargados de soportar por mucho tiempo contracciones (como son los músculos posturales) tienen una mayor concentración de fibras lentas; mientras que los músculos encargados de generar movimientos rápidos y fuertes se componen principalmente de fibras rápidas. Por lo anterior podemos mencionar que existen músculos lentos y músculos rápidos, aunque esto no significa que estos músculos sólo tengan fibras de un tipo.

- *Fibras musculares de contracción rápida*

Las fibras musculares rápidas se caracterizan por llegar a su máxima fuerza en un periodo corto de tiempo (alta *velocidad de contracción*). Para lograr esto requieren de una reserva grande de energía y una gran capacidad de agotarla rápidamente.

Cuando una fibra de contracción rápida se encuentra en constante trabajo primero agota las reservas en forma de fosfocreatina y posteriormente utiliza predominantemente un

metabolismo glucolítico que no requiere de metabolismo aeróbico; sino que utiliza los mecanismos de fermentación láctica. Estos mecanismos de obtención de energía generan un menor rendimiento y mayor agotamiento de los recursos.

Cabe resaltar que en años recientes a partir de las fibras rápidas se han caracterizado varios subtipos con velocidades y metabolismos intermedios.

Cuando se grafica la fuerza generada por periodo de tiempo por este tipo de fibra o un músculo de contracción rápida, se obtienen registros en donde la fuerza máxima se alcanza rápidamente pero son incapaces de mantenerla por un tiempo prolongado y van perdiendo tensión, es decir, se fatigan (Figura 1.12 Panel A).

Dentro de los músculos que predominantemente tienen este tipo de fibras rápidas podemos mencionar a los extensores y a los flexores de los dedos, entre otros.

- *Fibras musculares de contracción lenta*

Las fibras de contracción lenta se caracterizan por su alta resistencia a la fatiga y por una baja velocidad de contracción. Para lograr estas características fisiológicas este tipo de fibras requieren de otro tipo de metabolismo en el que los recursos se usen gradualmente para que la contracción pueda mantenerse por largos periodos de tiempo. El metabolismo que predomina en estas fibras es el *metabolismo oxidativo* de la glucosa en donde, a través de la utilización de las moléculas de Acetil coenzima A y Oxígeno (O₂) proveniente de la respiración, se producen equivalentes reductores como el NADH y FADH que activan la cadena respiratoria. Esta cadena respiratoria activa a la ATPsintasa y produce ATP por medio de fosforilación oxidativa generando agua y calor.

Debido a que para este tipo de metabolismo se requiere mayor cantidad de oxígeno, estas fibras tienen un mayor número de capilares, un mayor número de mitocondrias y una importante cantidad de una proteína conocida como mioglobina, que fija oxígeno en presencia de hierro, lo que le otorga un color más rojizo a los músculos de contracción lenta. Esta diferencia de color hace posible distinguir a simple vista a los músculos de contracción rápida (blancos) de los de contracción lenta (rojos).

Cuando graficamos la fuerza generada por periodo de tiempo de estas fibras obtenemos una contracción que tarda en llegar a su fuerza máxima pero que es capaz de mantenerla por un periodo largo sin fatigarse (Figura 1.12 Panel B).

Entre los músculos que contienen mayoritariamente este tipo de fibras están los posturales y el músculo *Soleus* entre otros.

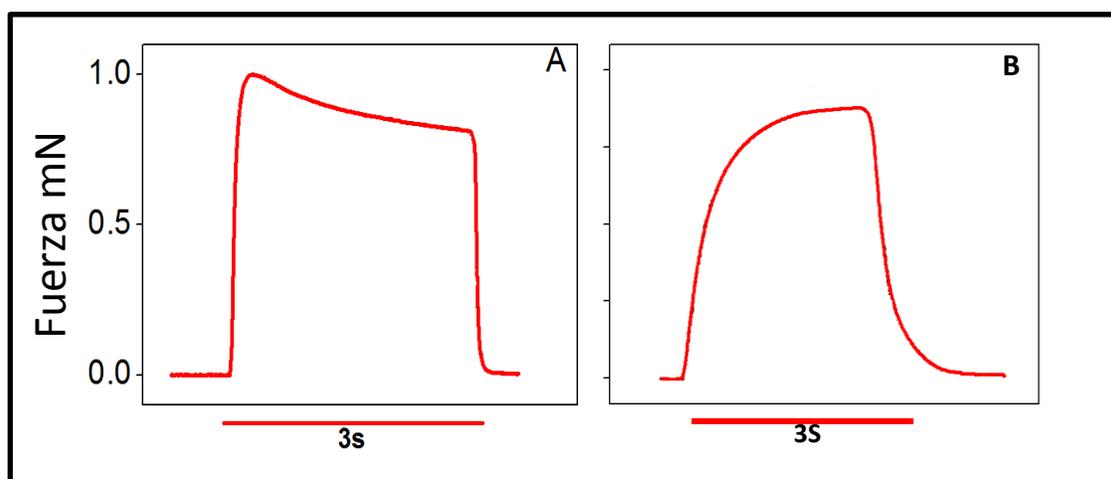


Figura 1.12. Registro de fuerza representativo de un músculo rápido y uno lento.

Panel A: Registro de fuerza de un músculo rápido por un periodo de 3 segundos. Panel B: registro de fuerza de un músculo lento por un periodo de 3 segundos.

En el cuadro 1 se resumen las características generales de cada tipo de fibra muscular.

Cuadro 1. Propiedades de los tipos de fibras musculares.

Características	Tipos de fibras	
A) HISTOLÓGICAS	I	II
Tamaño	Pequeño	Grande
Color	Rojo	Blanco
Densidad capilar	Alta	Baja
Mitocondrias	Numerosas	Escasas
Densidad mitocondrial	5.60%	0.7-3.25%
B) FISIOLÓGICAS		
Velocidad de contracción	Lenta	Rápida
Tiempo de contracción	99-140ms	40-88ms
Velocidad de relajación	Lenta	Rápida
Máxima tensión	12g	25g
Elasticidad	Alta	Baja
Fuerza/intensidad	Lento desarrollo/baja intensidad	Rápido desarrollo
Función	Aplomos y resistencia	Propulsión y velocidad
C) METABÓLICAS		
Capacidad oxidativa	Alta	Baja
Capacidad glucolítica	Baja	Alta
D) PROTEÍNAS		
Cadena pesada de miosina en humano	MyoHC tipo 2	MyoHC tipo 1
SERCA	SERCA ₂	SERCA ₁

(Modificado de López Rivero 1988)

El tipo de fibras junto con los patrones de estimulación ejercidos por el Sistema Nervioso sobre el músculo generan los movimientos fisiológicos de los organismos.

1.2 Comunicación entre el Sistema Nervioso y el músculo

El principal controlador de las respuestas contráctiles del músculo es el Sistema Nervioso (SN). Gracias a su acción el músculo esquelético se contrae a voluntad y no de manera autónoma, lo que sucede en estados patológicos como en el síndrome de Parkinson.

Para que esta regulación de la contracción muscular se lleve a cabo de manera correcta, existen diversos mecanismos.

1.2.1 Mecanismos regulatorios de la contracción muscular

El SN controla los movimientos del cuerpo gracias a la acción coordinada de diferentes *vías motoras*. Estas *vías motoras* comienzan en regiones del Sistema Nervioso Central (SNC) y se extienden a través de la médula espinal en donde realizan relevos o extienden sus axones por las regiones externas al SNC, conformando una parte del Sistema Nervioso Periférico (SNP).

El SNP se comunica con el músculo esquelético por medio de sus dos partes: *la somática* y *la visceral o autónoma*.

La parte somática que inerva al músculo esquelético es la responsable de la regulación de la *contracción muscular voluntaria*. Para controlar los movimientos precisos del cuerpo, el SN somático inerva los músculos del cuerpo por medio de un número determinado de fibras nerviosas. Cuando un músculo se especializa en movimientos precisos y coordinados el sistema nervioso somático inerva a los diversos fascículos que conforman a un músculo con un gran número de motoneuronas diferentes; de esta manera puede coordinar diversas contracciones de manera independiente a diferentes tiempos, que no siempre generan una gran fuerza. Un ejemplo de este tipo de contracciones musculares sería la contracción de los músculos flexores y extensores de los dedos; estos músculos son inervados por un gran número de neuronas y son capaces de realizar movimientos

precisos y coordinados al realizar actividades delicadas como por ejemplo escribir (Figura 1.13 panel A).

Por otro lado, cuando un músculo requiere de una gran fuerza para realizar un movimiento pero no tanta coordinación, las fibras musculares son inervadas por un número reducido de neuronas; de esta manera la mayoría de las fibras se contraen de una manera simultánea para generar gran fuerza en un solo momento. Un ejemplo de este tipo de inervaciones sería la de los músculos flexores y extensores de las piernas que se contraen rápida y fuertemente para dar un salto (Figura 1.13 panel B).

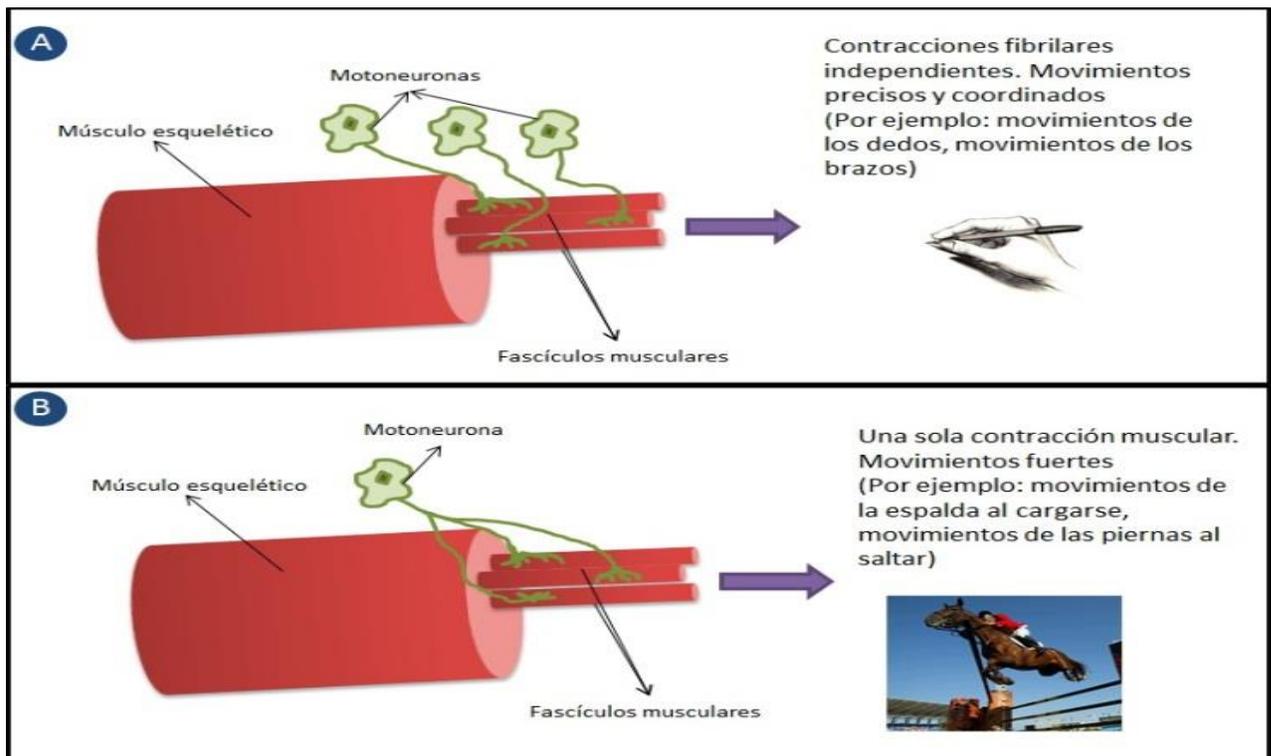


Figura 1.13 Mecanismos de inervación del músculo esquelético

Aunque la parte visceral del SNP recibe su nombre debido al control involuntario de las vísceras, se subdivide en dos sistemas con diferentes funciones: el *Sistema Nervioso Parasimpático* (SNPs) y el *Sistema Nervioso Simpático* (SNS).

1.2.2 Sistema Nervioso Parasimpático

Este sistema es el responsable de regular a los órganos internos y las glándulas de manera inconsciente (parte visceral).

Este sistema controla las acciones del cuerpo en un estado de digestión y reposo. Dentro de las actividades reguladas durante este estado se encuentran: la excitación sexual, los ritmos cardíaco y respiratorio, la salivación, la micción, la defecación y los movimientos peristálticos durante la digestión.

Se dice que este sistema es complementario a la otra rama del sistema vegetativo; el SNS.

1.2.3 Sistema Nervioso Simpático

El SNS es el encargado de llevar al organismo a un estado de alerta, a un estado más comúnmente conocido como *estado de fight-or-flight* (huida o pelea). Aunque este sistema pareciera sólo funcionar en situaciones de estrés, está siempre activo manteniendo la homeostasis del cuerpo.

Esta parte del sistema nervioso principalmente actúa por medio de dos neurotransmisores conocidos como catecolaminas: *la adrenalina (epinefrina)* y *la*

noradrenalina (norepinefrina). La adrenalina es liberada de la glándula adrenal mientras que la noradrenalina es liberada por axones de neuronas estimuladas con acetilcolina.

El sistema encargado de la liberación de adrenalina se conoce como sistema adrenérgico y es de suma importancia para este trabajo.

1.3 Sistema adrenérgico

Cuando la adrenalina o la noradrenalina se unen a un receptor específico, se desata una respuesta biológica que depende del tipo del receptor que está siendo estimulado. Es decir, la adrenalina puede producir respuestas muy diversas dependiendo del tipo de receptor que haya en su tejido blanco. Debido al nombre de las moléculas que se les unen, estos receptores se conocen como la familia de los adrenoceptores.

En 1948 fueron catalogados y descritos dos tipos principales de receptores específicos (Ahlquist R.P. *et al.* 1948); *los receptores alfa (α)* que fueron descritos como receptores que producen una respuesta excitatoria y *los receptores beta (β)* que tenían como efecto respuestas inhibitorias.

En el panorama actual los adrenoceptores han sido estudiados más detalladamente y se han clasificado en nueve subtipos (3 subtipos de receptores α_1 , 3 subtipos de receptores α_2 y 3 subtipos de receptores β).

Aunado a esta gran variedad de receptores las proteínas con las que se comunican ejercen diversos efectos intracelulares.

Aunque las respuestas a nivel muscular más estudiadas de dichos receptores, han sido las que producen en células del corazón, se ha descrito que los *receptores beta 2 (β_2)* predominan en el músculo esquelético (Kim YS *et al.* 1991 y Rattigan S *et al.* 1986).

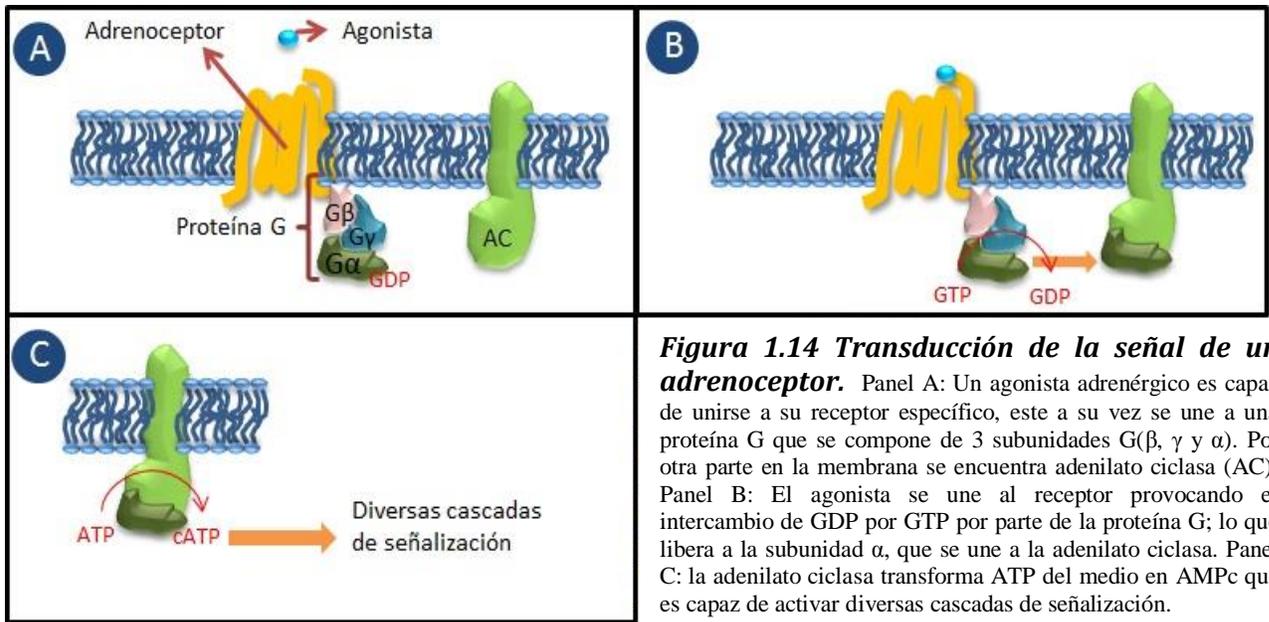
1.3.1 Mecanismo de acción de los adrenoceptores

Todos los adrenoceptores pertenecen a la familia de los receptores proteínicos acoplados a proteínas G y forman el mayor grupo de receptores de membrana de mamíferos (Francis SH *et al.* 2001). Estos receptores tienen 7 dominios transmembranales helicoidales y una proteína G anclada al receptor en la parte interna de la membrana plasmática.

Las proteínas G, son capaces de mediar una gran cantidad de respuestas diferentes ya que tienen diferentes subunidades. Las subunidades $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$) forman un dímero estrechamente unido al receptor y a la parte interna de la membrana plasmática. Por otra parte, la subunidad α ($G\alpha$) en su estado inactivo, se encuentra unida al dímero $G\beta\gamma$ (Figura 1.12 Panel A).

Cuando la molécula específica se une a su receptor éste sufre un cambio conformacional que activa a su proteína G adyacente. La proteína G activada intercambia una molécula de guanósín difosfato (GDP) por una de guanósín trifosfato (GTP) y libera a la subunidad $G\alpha$ activándola, esto produce que se una a su enzima blanco y provoque su activación (Figura 1.12 panel B).

La mayoría de la señalización mediada por el sistema beta-adrenérgico involucra a la Adenilil ciclase (AC) que también se encuentra anclada a la membrana celular. Esta enzima es activada por la subunidad α de la proteína G y transforma una molécula de Adenosín mono fosfato (AMP) en una molécula de AMP cíclico (AMPc). A su vez, este AMPc tiene diversos efectos sobre otras proteínas celulares actuando como segundo mensajero celular. (Figura 1.12 panel C).



Al ser el grupo más grande de receptores transmembranales, estas proteínas G tienen que ser capaces de generar diversas vías de señalización; es decir, tienen que ser capaces de activar muchas enzimas efectoras. Existe una gran variedad de subunidades de las proteínas G (como mínimo 27 G_{α} , 7 G_{β} , y 13 G_{γ}) lo que permite que haya una gran combinatoria posible, que activarán múltiples vías de señalización y, por lo tanto, diversos efectos celulares (Bodine SC *et al.* y Lohse MJ *et al.* 1999). Estas vías de señalización se hacen más complejas ya que los dímeros $G_{\beta\gamma}$ también son capaces de activar enzimas efectoras.

Para lograr los efectos celulares deseados, la industria farmacéutica ha sintetizado diversos *agonistas* y *antagonistas* de cada receptor. Los agonistas son capaces de activar la respuesta de dicho receptor, mientras que los antagonistas se unen con alta afinidad ocupando el lugar del agonista y de esta manera impiden que el receptor se active.

En el cuadro 2 se resumen los efectos de algunas de estas combinaciones en los principales tejidos, sus principales agonistas y agonistas y el efecto que su activación produce en músculo esquelético (Milligan G *et al.* 1998).

Cuadro 2. Subtipos de adrenoceptores, sus proteínas G y sus efectos en diferentes tejidos.

Adrenoceptor	A		β		
Isoformas	α _{1A} , α _{1B} y α _{1D}	α _{2A} , α _{2B} y α _{2C}	β ₁	β ₂	β ₃
Isoforma acoplada	Gα _q Familia (α ₁₁ /α ₁₄ /α ₁₅ /α ₁₆)	Gα ₁₂ Familia (α ₀₁ /α ₀₂)	Gα _s	Gα _s Familia (α ₁₁ /α ₁₂ /α ₁₃)	Gα _s Familia (α ₁₁ /α ₁₂ /α ₁₃)
Efecto	Activación de PLC Activación de PLD Activación de PLA ₂ Activación de los canales de Ca ²⁺ Activación de intercambiadores de Na ⁺ /H ⁺ Modulación de canales de K ⁺ Aumento de la señalización por MAPK	Inhibición de AC Disminución del cAMP Inhibición de PKA	Activación de AC Aumento del cAMP Activación de la PKA Activación de los canales de Ca ²⁺ tipo L Inhibición de PLN	Activación de AC Aumento del cAMP Inhibición de PKA Activación de los canales de Ca ²⁺ tipo L Inhibición de AC Disminución del cAMP Inhibición de PKA	Activación de AC Aumento del cAMP Inhibición de PKA Activación de los canales de Ca ²⁺ tipo L Inhibición de AC Disminución del cAMP Inhibición de PKA
Principales tejidos donde se encuentran	Vasos cardiacos Músculo liso	SNC coronario Vasos sanguíneos Páncreas Plaquetas	Corazón Músculo esquelético	Corazón Pulmón Vasos sanguíneos Riñones	Tejido adiposo Corazón

			Músculo esquelético		
Efecto principal en músculo esquelético	Vasoconstricción de arteriolas de gran resistencia	Vasoconstricción de arteriolas precapilares pequeñas	¿?	Hipertrofia	¿?
Agonistas comunes	Cirazolina	Clonidina	Xamoterol	Clenbuterol	BRL 37344
	M-6434	UK14304	Prenalterol	Fenoterol	CGP12177
	Metoxamina	BHT-920	Denopamina	Salbutamol	Carazolol (Méjean A <i>et al.</i> 1995)
	Fenilefrina			Salmeterol	
Antagonistas comunes	Corinantina	Yohimbina	CGP20712A	ICI-118551	SR59230A
	Prazosina	Rauwolscina	Alprenolol	Butoxamina	
	Fentolamina		Carazolol (Costin B <i>et al.</i> 1983, Innis RB <i>et al.</i> 1979)	Carazolol (Costin B <i>et al.</i> 1983, Innis RB <i>et al.</i> 1979)	

(Modificado de Lynch. *et al* 2008)

Gracias al conocimiento de los efectos de la activación de los receptores β , en los últimos años se han sintetizado fármacos agonistas que promueven la hipertrofia muscular conocidos como *anabólicos*. Estos fármacos también favorecen la lipólisis y son usados ilegalmente por deportistas de alto rendimiento y por la industria veterinaria (Choo JJ *et al.* 1992, Emery PW *et al.* 1984, Gregorevic P *et al.* 2002, Hinkle RT *et al.* 2002). Tal es el caso del agonista para los receptores tipo β_3 *Carazolol* que fue utilizado en el presente trabajo.

1.3.2 Receptores adrenérgicos β_3

Después de la primera clasificación de los receptores adrenérgicos en dos subtipos, comenzó a surgir evidencia sobre un tipo de receptor con características únicas (Arch *et*

al. 1984, Stock and Sudera 1989, Yong-Ling Liu *et al.* 1995). Al encontrar moléculas *antagonistas competitivas* de los agonistas beta adrenérgicos clásicos que tenían un efecto agonista sobre la célula: se describieron y caracterizaron los receptores β_3 adrenérgicos (Emorine *et al.* 1989). Este tipo de receptores se expresan en humanos en la membrana celular de tejidos y órganos tales como la vesícula biliar, la próstata, el colon, el *músculo esquelético*, el corazón y el tejido adiposo.

Los receptores tipo β_3 se consideran atípicos gracias a que o no son bloqueados o lo son muy escasamente por bloqueadores beta clásicos y una de sus principales características es que bloquean los efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos que producen las catecolaminas u otros fármacos agonistas adrenérgicos.

El primer efecto descubierto de los agonistas de dichos receptores en los mamíferos fue la inducción de la lipólisis en el tejido adiposo café (Arch JRS *et al.* 1984) lo que incitó a los investigadores a secuenciar y describir las características del receptor para utilizarlo como un blanco para drogas anti-obesidad (Strosberg D 1997). Actualmente las alteraciones de dichos receptores se han asociado con obesidad y con *Diabetes Mellitus tipo 2* (Gerhardt *et al.* 1999).

Hasta la fecha los estudios en seres humanos no han sido suficientes para utilizar combinaciones de agonistas/antagonistas de estos receptores para combatir la obesidad o la diabetes.

Además, se han descrito otros efectos en diferentes organismos o tejidos, algunos de los cuales se resumen en el siguiente cuadro.

Cuadro 3. Efectos de algunos agonistas de los receptores adrenérgicos tipo β_3

Estudio	Efecto	Tejido u organismo
Arch JRS <i>et al.</i> 1984	Lipólisis	Tejido adiposo café y blanco
Gauthier C <i>et al.</i> 1996	Efecto inotrópico negativo	Cardiaco
Anthony A <i>et al.</i> 1996	Vaso relajación-regulación de la motilidad intestinal	Tracto gastrointestinal
Board M <i>et al.</i> 2000	Induce beta oxidación	Músculo esquelético (<i>Soleus</i>)
Barouch <i>et al.</i> 2002	Activación de la bomba Na^+/K^+	Corazón
Miller <i>et al.</i> 1999	Aumento del consumo de O_2	Humano
Durrant <i>et al.</i> 1980	Reducción de 15% del peso	Humano (pacientes obesos)
Fiser M. H, <i>et al.</i> 1998	Aumento de la tasa metabólica	Mono Rhesus

Aunque el efecto que estos agonistas tienen o pueden tener sobre el músculo esquelético es escaso, existen fármacos que se utilizan en la industria veterinaria para animales cuya carne está destinada a consumo humano y existen evidencias sobre el efecto de activación que estos fármacos tienen sobre proteínas como el Fosfolamban en corazón, regulando el flujo del Ca^{2+} sarcoplásmico (Brittsan AG 2000, MacLennan DH 2003 & Tada M. 2003).

1.4 Carazolol

El *Carazolol* fue descrito originalmente como un potente bloqueador de los receptores β -adrenérgicos 1 y 2 (Costin B *et al.* 1983, Innis RB *et al.* 1979); sin embargo, en la actualidad se conoce su efecto agonista sobre los receptores β tipo 3 (Méjean A *et al.* 1995); aunque

la vía de señalización y los efectos que producen los agonistas β_3 en músculo esquelético se desconocen (Gordon S, *et al.* 2008).

A pesar de la escasez de información, el fármaco se vende en grandes cantidades a los productores de carne magra destinada para consumo humano en toda América latina.

Este fármaco se utiliza aprovechando sus propiedades bloqueadoras de los receptores β tipo 1 y 2, ya que inhibe el efecto que las catecolaminas liberadas durante situaciones estresantes produce sobre el músculo esquelético, además de los posibles efectos derivados de su actividad como agonista β_3 .

Cuando un animal se encuentra bajo una situación estresante, su organismo libera adrenalina que activa los receptores β_1 y β_2 . La activación de dichos receptores tiene un efecto negativo sobre la carne procesada haciéndola más dura y de menor calidad.

Debido a lo anterior, el *Carazolol* se aplica intramuscularmente antes de una situación estresante (ej. traslados, antes del sacrificio, partos, etc.) para disminuir los efectos que tienen las catecolaminas sobre la carne magra (Warris P.D, *et al.* 1982).

1.4.1 Fórmula

El *Carazolol* tiene la siguiente fórmula química:

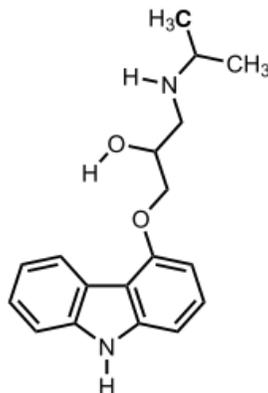


Figura 1.15 Fórmula química del *Carazolol*

A lo largo de los años se han realizado pocos estudios sobre los efectos que tiene este fármaco sobre el músculo esquelético, mismos que describo a continuación.

1.4.2 Efectos del *Carazolol* sobre el músculo esquelético

Existe una tesis de maestría (Valderrama M 2009) en la cual se describe que cuando se aplica *Carazolol* de manera intramuscular a caballos deportivos se observa una transformación del metabolismo y el tipo de fibra muscular rápida (fatigable) hacia un tipo muscular predominantemente lento (no fatigable) con metabolismo oxidativo; por lo que hay una disminución de la glucólisis. También se observa una transformación de las fibras tipo I hacia tipo II en músculo de caballo en entrenamiento, lo que no sucede con el músculo de caballo en periodos largos de inactividad física. También se ha observado que al administrar *Carazolol* se incrementa la cantidad de capilares que irrigan las fibras musculares.

Estos efectos fueron más evidentes en aquellos caballos que eran entrenados constantemente y a largo plazo; estos caballos aumentaron su rendimiento en las pruebas de resistencia.

En este trabajo también se observó una reducción del área ocupada por las fibras musculares al ser tratadas con *Carazolol*, lo que se atribuye al efecto lipolítico de los receptores adrenérgicos β_3 .

Es interesante recalcar que en este estudio las fibras se volvieron más resistentes a la fatiga muscular durante las competencias de los caballos; sin embargo las propiedades mecánicas del músculo rápido y lento en presencia de *Carazolol* encontradas en este trabajo son resultado del uso crónico de la droga que afecta a nivel sistémico.

Cabe recalcar que éste es el primer estudio que también revela algunos hechos a nivel celular y subcelular que pueden ser utilizados para entender el proceso fisiológico de fatiga y del efecto que pudiera tener el consumo humano de músculo contaminado con este tipo de fármacos.

2. Planteamiento del problema

El músculo esquelético es el tejido más abundante de los vertebrados y uno de los efectores del sistema nervioso central. En la industria de la producción animal para consumo humano y en el área de la fisiología del ejercicio de caballos o de atletas de alto rendimiento, el músculo adquiere especial importancia. Para mejorar la calidad del músculo (carne magra) para su consumo y para mejorar la función mecánica del músculo durante el ejercicio retrasando la aparición de la fatiga, se han creado fármacos que potencian la hipertrofia y disminuyen la cantidad de grasa en el músculo; por lo general estos son agonistas de los receptores adrenérgicos β tipo 2. Dentro de las drogas creadas con estos objetivos destaca el antagonista adrenérgico de los receptores tipo β 1 y 2 que también es un agonista de los receptores tipo β 3: el *Carazolol*. Aprovechando sus propiedades de bloqueador de los primeros dos tipos de receptores, este fármaco se

utiliza para disminuir los efectos que las situaciones estresantes tienen sobre la carne magra. El *Carazolol* se administra de manera indiscriminada a los animales y se desconocen los efectos que puede tener sobre los músculos así como su mecanismo de acción. Los estudios actuales en los que se ha utilizado este fármaco han demostrado que tiene propiedades anabólicas cuando se utiliza de manera crónica, pero no se ha estudiado su efecto agudo sobre las células musculares. Además de estos factores esta droga es una herramienta útil para estudiar las propiedades mecánicas del músculo y su consecuencia fisiológica, la fatiga ya que modifica las propiedades fisiológicas del ejercicio animal.

2.1 Objetivo

Determinar el efecto que tiene el *Carazolol* sobre las propiedades mecánicas de los dos tipos de músculo esquelético: lento y rápido.

2.2 Hipótesis

Debido a que el *Carazolol* es utilizado para mejorar el rendimiento de caballos en entrenamiento, se propone que ésta droga modifica las propiedades mecánicas de los músculos con ambos tipos de contracción (rápida y lenta) favoreciendo su metabolismo oxidativo, aumentando su resistencia a fatiga y reduciendo el tiempo de recuperación de ambos tipos musculares.

3. Materiales y métodos

3.1 Animales

Todos los procedimientos se realizaron con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Recursos Animales de laboratorio tanto de los Estados Unidos como de México y fueron aprobadas por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (NOM-062-ZOO1999).

3.1.1 Ratas

Para todos los estudios se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 150 gramos de peso proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Se disecaron los músculos *Extensor Digitorum Longus* (músculo esquelético de contracción rápida) y *Soleus* (músculo esquelético de contracción lenta) de las extremidades posteriores de los animales y se colocaron en solución Krebs oxigenada a 37°C.



Figura. 2.1 Rata Wistar.

3.2 Fármacos y soluciones

3.2.1 Solución Krebs

Se utilizó la solución de Krebs en todos los experimentos, como solución fisiológica isotónica con los nutrientes necesarios para mantener a las células vivas.

Cuadro 2.1 Componentes y proporciones de la solución Krebs.

Sustancia	Molaridad (M)	Masa Molar	Gramos/Litro
NaCl	0.135	58.44	7.89
KCl	0.005	74.55	0.373
MgCl	0.001	203.3	0.203
NaHCO ₃	0.015	84.01	1.26
Na ₂ HPO ₄	0.001	142	0.142
C ₆ H ₁₂ O ₆	0.011	180.2	1.98
CaCl ₂	0.0025	147	0.0367

La solución de Krebs tiene un pH aproximado de 8.06, el cual se modifica cuando se burbujea con un gas cuya composición es O₂ al 95% y CO₂ al 5%, que reduce el pH a 7.4 lo cual es fisiológicamente compatible con el interior de la célula muscular (Medina J 2010).

Todos los experimentos realizados en solución Krebs se mantuvieron a 37°C.

3.2.2 Carazolol

Debido a que se desconocen las concentraciones de *Carazolol* que tienen un efecto sobre los músculos esqueléticos *in vitro*, se realizaron curvas dosis-respuesta a las siguientes concentraciones:

Cuadro 2.2 Concentraciones de Carazolol utilizadas.

Concentración
0.05 μM
0.1 μM
0.5 μM
10 μM
20 μM
30 μM

3.3 Aislamiento de los músculos

Para este trabajo se utilizaron dos tipos de músculos tomándolos como representativos de dos tipos de metabolismo y comportamiento/función (de contracción rápida y lenta): el EDL y el *Soleus*, respectivamente.

Tanto en el humano como en la rata, el músculo EDL se encuentra entre el *Tibialis* anterior y los músculos *Peroneus* sobre las caras anteriores de la *Fibula* y de la tibia. El tendón proximal del EDL se origina en el cóndilo lateral de la *Tibia*, en el asta anterior de la *Fibula* y en la membrana interósea. El tendón distal se divide, a la altura de la retináculo

de los extensores, en cuatro. Estos cuatro tendones corren sobre la superficie dorsal del pie para insertarse en las falanges mediales y distales del segundo al quinto orjejo. Este músculo al contraerse concéntricamente acerca los cuatro orjejos de los pies a la *Tibia* y la *Fibula* (Biel, Andrew R 2010) (Figura 2.2).

El músculo *Soleus* se encuentra por debajo de los músculos *Gastrocnemius* (gemelos) por la parte posterior de la *Fibula* y de la *Tibia*. El tendón proximal del *Soleus* se origina en la superficie proximal posterior de la *Tibia* y en la parte proximal posterior de la cabeza de la *Fibula*. El *Soleus* y los *Gastrocnemius* forman la estructura que se conoce como "tríceps surae" que se convierte en el tendón *Calcaneal* (*Achilles*), el cual se inserta en la parte posterior del hueso *Calcaneus*. A diferencia del músculo EDL, el *Soleus* al contraerse concéntricamente acerca el hueso *Calcaneus* hacia la articulación de la rodilla por la parte posterior (Biel, Andrew R 2010) (Figura 2.2).

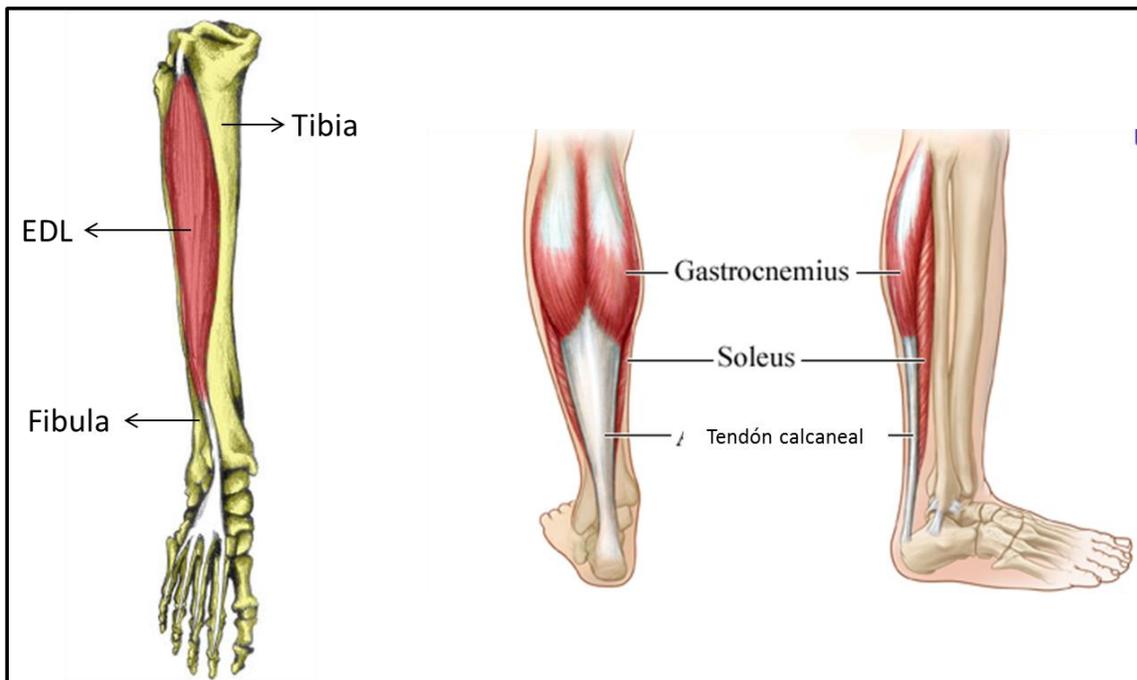


Figura. 2.2 Localización del EDL y Soleus en humano y en la rata.

Modificadas de:

http://www.teachpe.com/anatomy/muscles/extensor_digitorum_longus.php 2013 y

<http://offthelongrun.wordpress.com/2011/05/10/soleus-strain/>

Teniendo en cuenta la localización anatómica de los músculos se realizó la disección de la siguiente manera:

Los animales fueron sacrificados por medio de la dislocación de las vértebras cervicales. Posteriormente, se retiró la piel de las extremidades posteriores y se localizó el tendón más proximal a la rodilla. Este tendón fue anudado con hilo delgado y se cortaron los tendones distales. Se jaló con cuidado el músculo desde el hilo hasta que éste se separó de la pierna.

Para la colocación del músculo en la cámara de estimulación se realizaron nudos en forma de gasa en ambos tendones, para esto se utilizó el microscopio (WildM-8; Heerbrugg, Switzerland) e instrumental para microcirugía del laboratorio de Fisiopatología de músculo de la Facultad de Medicina.

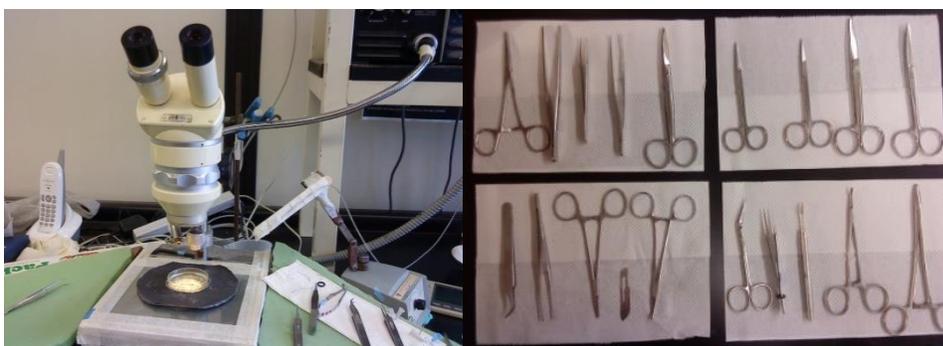


Figura 2.3. Microscopio y material quirúrgico utilizados.



Figura. 2.4 Nudos realizados en los tendones.

3.4 Procedimiento experimental

El músculo fue colocado en la cámara de estimulación e inmerso en solución Krebs o en una solución Krebs con *Carazolol*. Dentro de la cámara de estimulación el músculo fue sujetado a un extremo fijo por uno de los tendones y por el otro a la aguja de un transductor de fuerza. La solución de la cámara se encontraba en contacto con unos electrodos de platino que, a su vez, estaban conectados a un estimulador eléctrico.



Figura. 2.5 Músculo aislado y sujetado dentro de la cámara de estimulación.

El equipo utilizado para llevar a cabo la estimulación fue un estimulador GrassStimulator ML S-88, un transductor de fuerza AD Instruments ML-866, un amplificador y una fuente de poder NEXUS NPS-1 ResearchLaboratory.



Figura. 2.6 Estimulador, osciloscopio, transductor, fuente de poder y amplificador.

El estimulador eléctrico utilizado emite impulsos eléctricos de amplitud y frecuencia modulables que nos permiten realizar protocolos específicos para cada tipo muscular. Los impulsos eléctricos generan la contracción del músculo y esto es detectado por el transductor de fuerza, y transformado a una señal analógica que es detectada por la computadora, por medio del equipo Powerlab. La información es analizada por medio del software Labchart 6. Este procedimiento se resume en la figura 2.8. B.

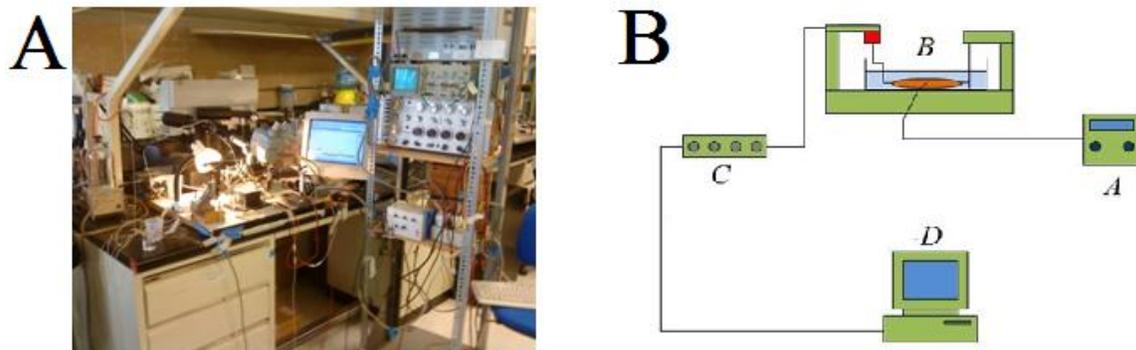


Fig. 2.7 A) Arreglo experimental. B) Esquema del arreglo experimental. En el panel B se resume la conexión de los aparatos utilizados; A: Estimulador, B: cámara de estimulación, C: Digitalizador PowerLab, D: computadora con LabChart6

3.4.1 Protocolo de estimulación.

Al momento de colocar los músculos en la cámara se midió la longitud entre ambos tendones y se estiraron a 1.3 veces su longitud con el objetivo de determinar su longitud óptima. Esto se corroboró por medio de sacudidas simples, ajustando la longitud del músculo hasta obtener la máxima respuesta (mayor fuerza de contracción).

Posteriormente se dieron tres tétanos para corroborar su desvanecimiento y se dejó reposar durante 20 minutos. Posterior a esto se dieron seis tétanos de fatiga separados 2 minutos entre sí.

Después de dejar reposar el músculo durante 20 minutos se aplicaron los tétanos de recuperación cada 20 minutos.

Si el músculo era tratado con *Carazolol* se incubaba 10 minutos con esta sustancia disuelta en solución Krebs y oxigenada a 37°C. Si el músculo era un experimento control sólo se incubaba con solución Krebs también 10 minutos antes de comenzar el protocolo de fatiga.

Las características de los estímulos se describen a continuación.

a) Sacudida simple

Todas las sacudidas simples utilizadas fueron impulsos únicos de 90 Voltios.

b) Tétanos

Los tétanos utilizados fueron impulsos sostenidos de 90 Voltios repetidos con una frecuencia de 75 Hertz durante tres segundos. Estos impulsos nos permiten medir la pérdida de tensión del músculo o desvanecimiento y nos ayudan a estudiar los movimientos de moléculas responsables de la contracción muscular.

c) Fatiga

Para medir la fatiga de un músculo se le dieron 6 tétanos con las características ya descritas, con 2 minutos de reposo entre cada uno.

d) Recuperación

Posterior a la fatiga el músculo fue sometido a más estimulaciones tetánicas espaciadas 20 minutos entre sí.

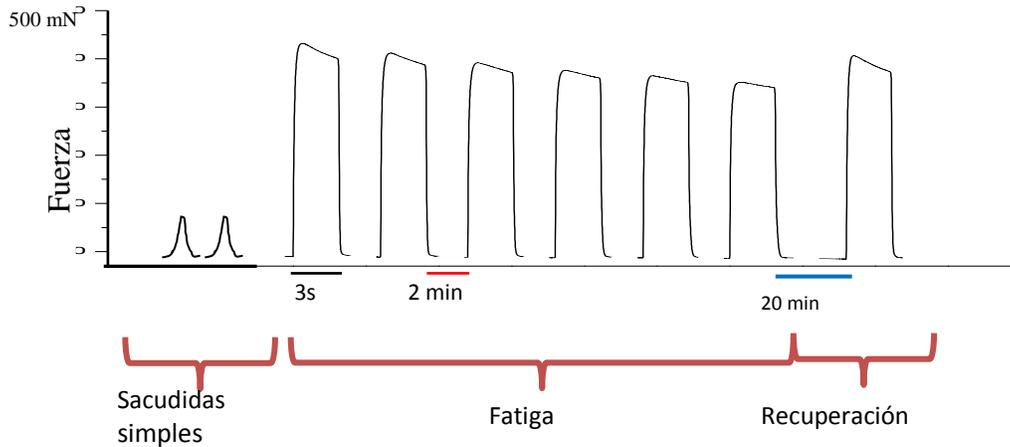


Figura 2.8 Esquema representativo del protocolo de estimulación.

3.4.2. Análisis de resultados y pruebas estadísticas

Para todos los análisis estadísticos la fuerza máxima del primer tétanos se dividió entre la fuerza máxima de los tétanos siguientes. Gracias a esta normalización se pudieron comparar los resultados de varios animales. Se realizaron análisis estadísticos para la fatiga, la recuperación y el desvanecimiento de los tétanos. Estos análisis se detallan a continuación:

- Fatiga. Para analizar los efectos del *Carazolol* sobre la fatiga muscular se utilizaron los puntos correspondientes a la fuerza máxima de los seis tétanos de fatiga. Estos puntos se compararon cada uno (control contra tratado) por medio de la prueba U de Mann-Whitney y, posteriormente, se compararon todos los tratados contra todos los controles por medio de una prueba Kruskal- Wallis.

- Recuperación. Para analizar la recuperación se hicieron dos comparaciones; en la primera se comparó el punto máximo del primer tétanos de la fatiga contra el punto máximo del primer tétanos de la recuperación y se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. Para la segunda comparación se tomaron los puntos correspondientes a la fuerza máxima del último tétanos de la fatiga y el primero de la recuperación y también se les aplicó la prueba U de Mann-Whitney.
- Desvanecimiento. Para analizar la forma del tétanos se utilizaron los seis tétanos correspondientes a la fatiga. Se asignaron dos puntos a la parte superior de la curva, que corresponde al periodo durante el cual se sostuvo la estimulación eléctrica: el de la extrema izquierda (denotado A) y el de la extrema derecha (denotado B). Posteriormente se realizó un cociente de B/A y el promedio de todos los experimentos de estos cocientes fue comparado con el correspondiente al mismo número de tétanos de la otra condición por medio de la prueba U de Mann-Whitney y, posteriormente, todos los tétanos de una condición contra todos los de la otra condición, por medio de una prueba Kruskal-Wallis

4. Resultados

4.1 *Músculo EDL*

4.1.1 Curva de concentración-respuesta EDL

Al realizar la curva de dosis-respuesta para determinar la concentración de *Carazolol* a utilizar, se encontró que a una dosis de 50 μM el músculo EDL no se recupera del

protocolo de fatiga, por lo que se tomó como dosis tóxica. La dosis que tuvo mejor efecto en el músculo EDL sin ser tóxica fue la de 30 μM ; a esta dosis los músculos tuvieron la mayor disminución de fuerza pero siguieron recuperándola (Figura 3.1).

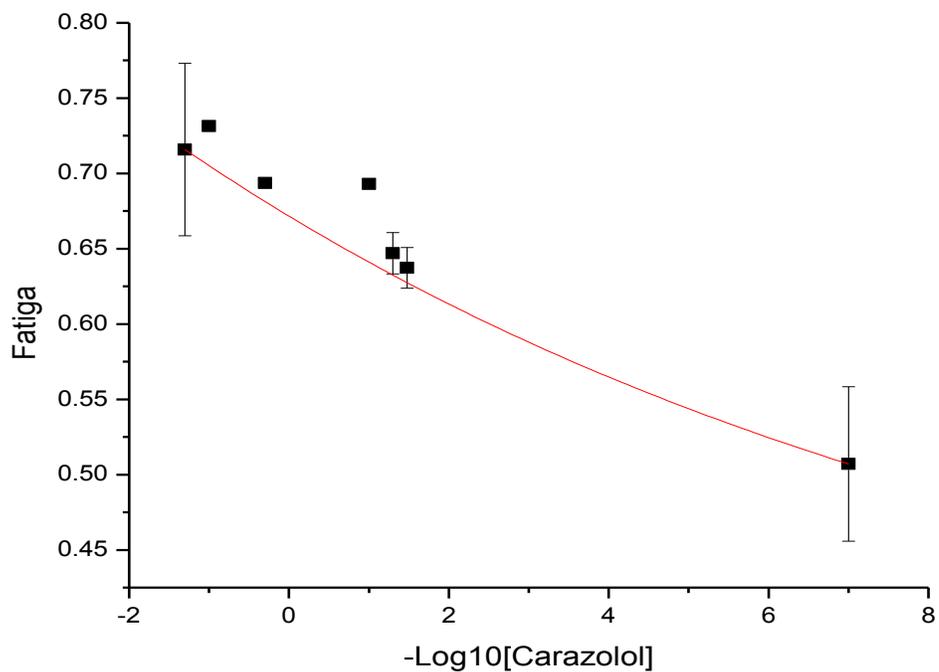


Figura 3.1. Curva concentración-respuesta sobre la fatiga del músculo EDL. Se representa la fuerza perdida normalizada contra el $-\text{logaritmo base 10}$ de la concentración después de un protocolo de fatiga. Las barras representan el error estándar.

Para facilitar el análisis de resultados todos los protocolos fueron normalizados contra la fuerza máxima del primer tétanos de la fatiga.

Debido a los resultados anteriores, todos los experimentos posteriores se realizaron con la dosis 30 μM de *Carazolol*.

4.1.2 Fatiga EDL

Cuando se realizó el protocolo de fatiga muscular se encontró que después de seis tétanos los músculos incubados con *Carazolol* redujeron su fuerza en un 20% aproximadamente con respecto a los controles. El análisis estadístico mostró que la diferencia estadística entre los grupos tratado y control para cada tétanos fue significativa. Esto sucedió cuando se comparó cada punto de la curva y cuando se compararon las curvas completas ($p < 0.05$) (Figura 3.2).

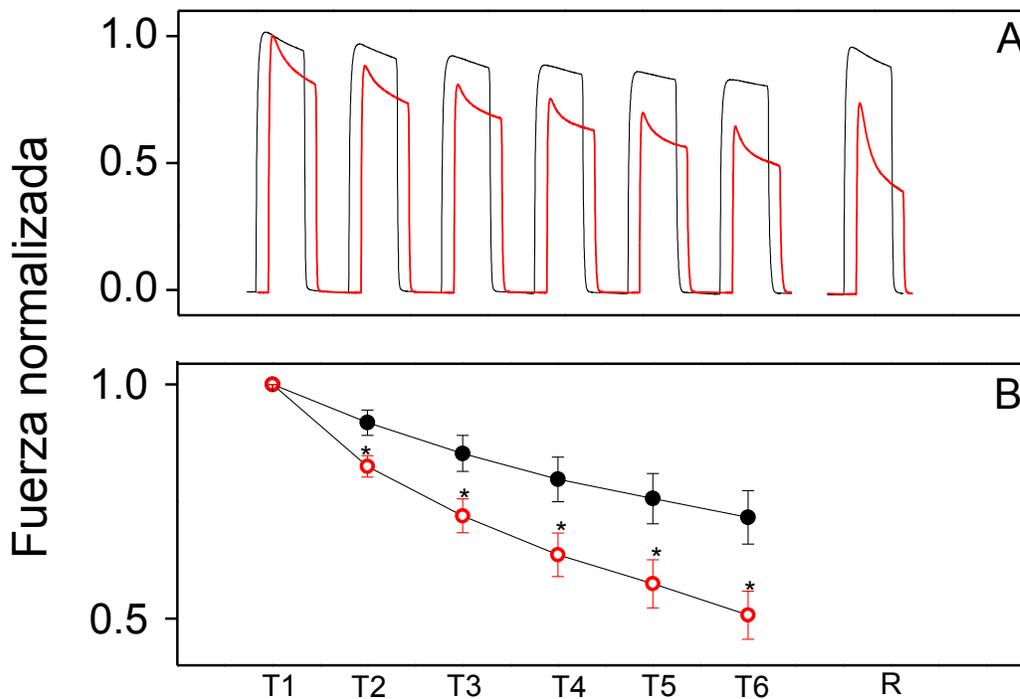


Figura 3.2. Efecto del Carazolol 30µM sobre la fatiga del músculo EDL. En el panel A se muestra un esquema representativo del protocolo de fatiga y del tétanos de recuperación para el músculo control (línea negra) y para el tratado (línea roja). En el panel B observamos el efecto del Carazolol sobre la fatiga del músculo EDL; Control (●) $n=5$, tratado (○) $n=5$. Pruebas utilizadas: U de Man-Whitney y Kruskal-Wallis. Las barras representan el error estándar. * $p < 0.05$

4.1.3 Recuperación EDL

Cuando comparamos al primer tétanos de la fatiga con respecto al primero de la recuperación encontramos que la fuerza del músculo EDL incubado con *Carazolol* disminuye en un 10% aproximadamente, comparada con el músculo control (Figura 3.3 panel A). Sin embargo, cuando comparamos el último tétanos de la fatiga con respecto al primero de la recuperación encontramos que el músculo EDL incubado con *Carazolol* recupera un 40% más de la fuerza perdida durante la fatiga, que el músculo control (Figura 3.3 panel B).

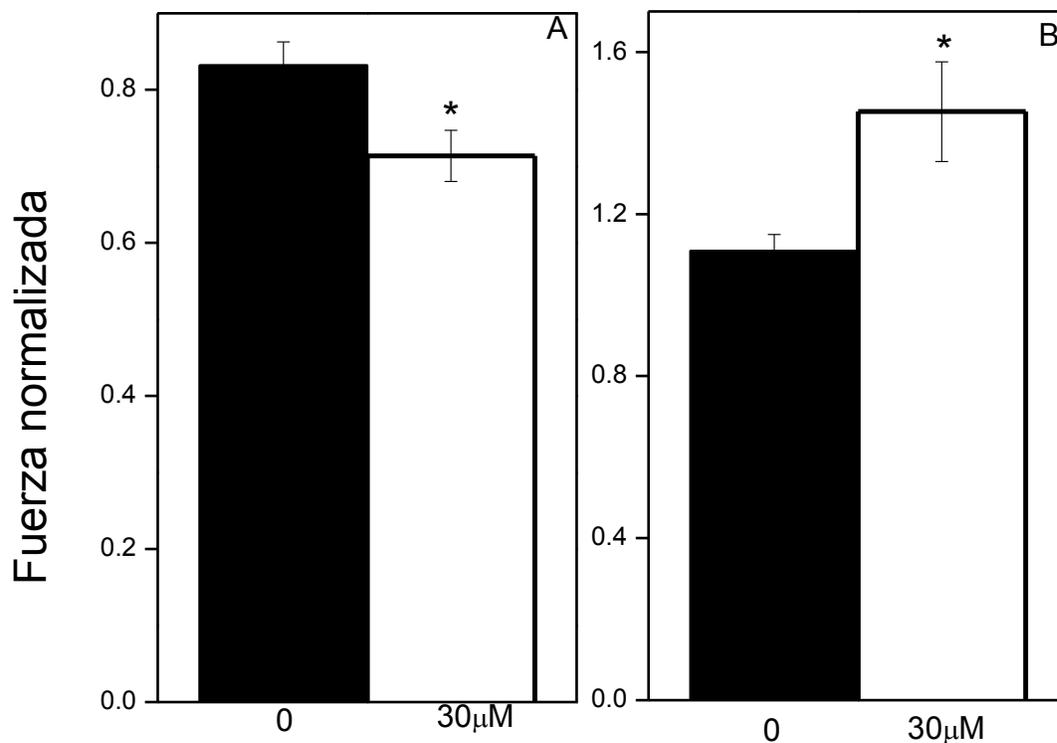


Figura 3.3. Fuerza de recuperación del músculo EDL. En el panel A se muestra la fuerza de recuperación total comparada con el primer tétanos de la fatiga. En el panel B se muestra la recuperación comparada contra el último tétanos de la fatiga. Control (●) n=5, tratado (○) n=5. Pruebas utilizadas: U de Man-Whitney y Kruskal-Wallis. Las barras representan el error estándar. *p<0.05

4.1.4 Desvanecimiento EDL

Cuando se analizó el desvanecimiento de la fuerza de los tétanos durante el protocolo de fatiga, se encontró que los músculos EDL tratados con *Carazolol* perdían más rápidamente la fuerza de contracción durante la estimulación tetánica, es decir tienen un menor desvanecimiento (Figura 3.4 Panel A).

Cuando se comparó el desvanecimiento entre cada uno de los tétanos de la curva de fatiga, se encontró que el músculo EDL tratado con *Carazolol* iba disminuyendo su desvanecimiento en cada tétanos de la fatiga, mientras que para el músculo EDL control no se modificaba dicha propiedad. La disminución del EDL tratado con *Carazolol* era aproximadamente un 30% menor a la del músculo control ($p < 0.05$) (Figura 3.4 Panel B).

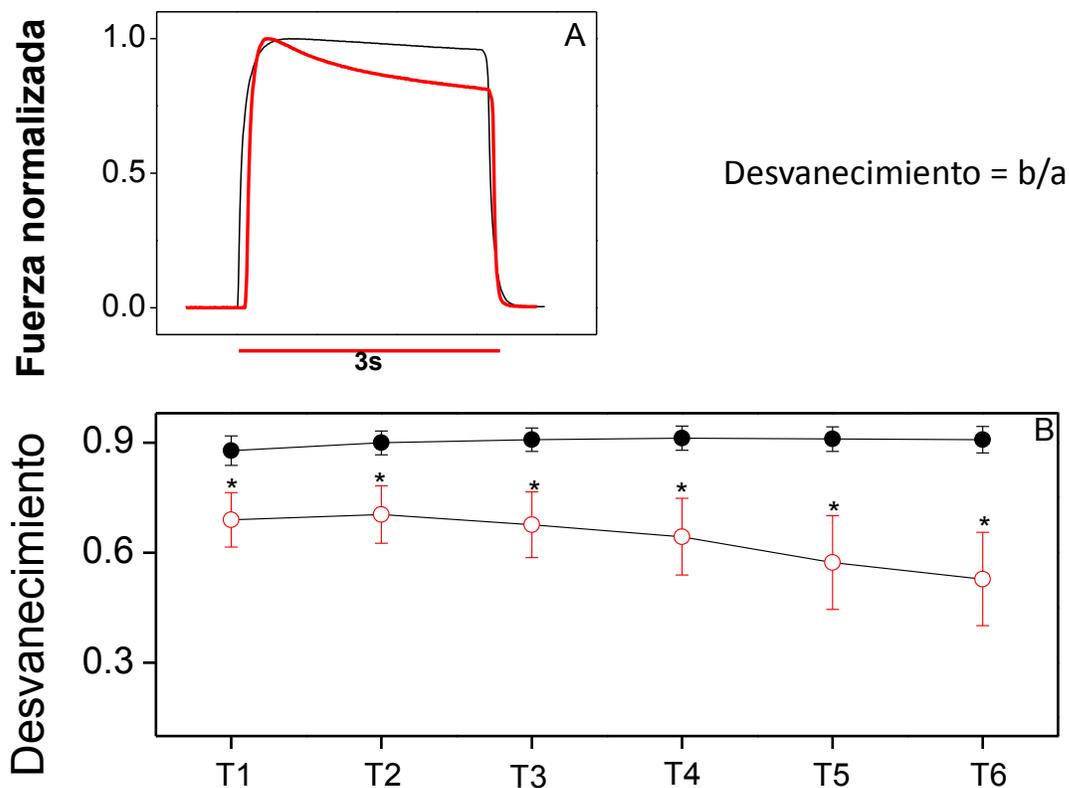


Figura 3.4. Efecto del Carazolol sobre el desvanecimiento del músculo EDL. En el panel A se muestran registros representativos del músculo control y del músculo tratado. En el panel B se muestra el efecto del desvanecimiento a lo largo del protocolo de fatiga. Control (●) $n=5$, tratado (○) $n=5$. Pruebas utilizadas: U de Man-Whitney y Kruskal-Wallis. Las barras representan el error estándar. * $p < 0.05$

4.2 Músculo Soleus

4.2.1 Curva de concentración-respuesta del *Soleus*.

Al realizar la curva de dosis-respuesta para determinar la concentración de *Carazolol* a utilizar se encontró que, al igual que el músculo EDL, a una dosis de 50 μM , el músculo *Soleus* no se recupera del protocolo de fatiga, por lo que se tomó como dosis tóxica (no se muestran los datos). La dosis que tuvo mejor efecto en el músculo *Soleus* sin ser tóxica fue la de 30 μM ; a esta dosis los músculos tuvieron la menor disminución de fuerza pero la recuperaron cuando se aplicó éste protocolo (Figura 3.5).

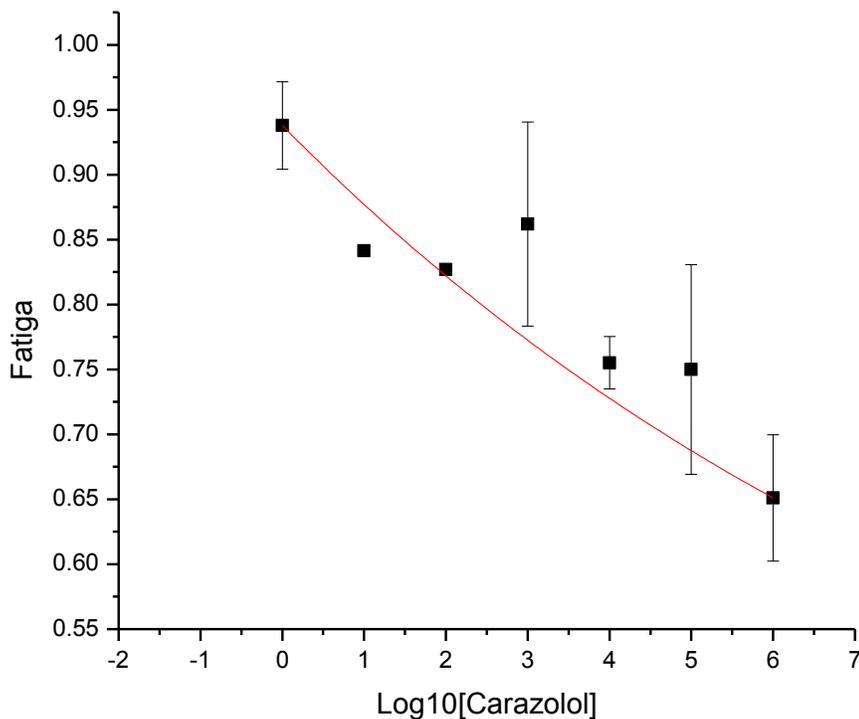


Figura 3.5. Curva dosis-respuesta sobre la fatiga del músculo *Soleus*. Se representa la fuerza normalizada perdida después de seis tétanos contra el logaritmo base 10 de la concentración de Carazolol. Las barras representan el error estándar.

4.2.2 Fatiga *Soleus*

Cuando se realizó el protocolo de fatiga muscular se encontró que después de 6 tétanos los músculos tratados con *Carazolol* redujeron su fuerza en un 35%, aproximadamente, con respecto a los músculos control ($p < 0.05$) (Figura 3.6).

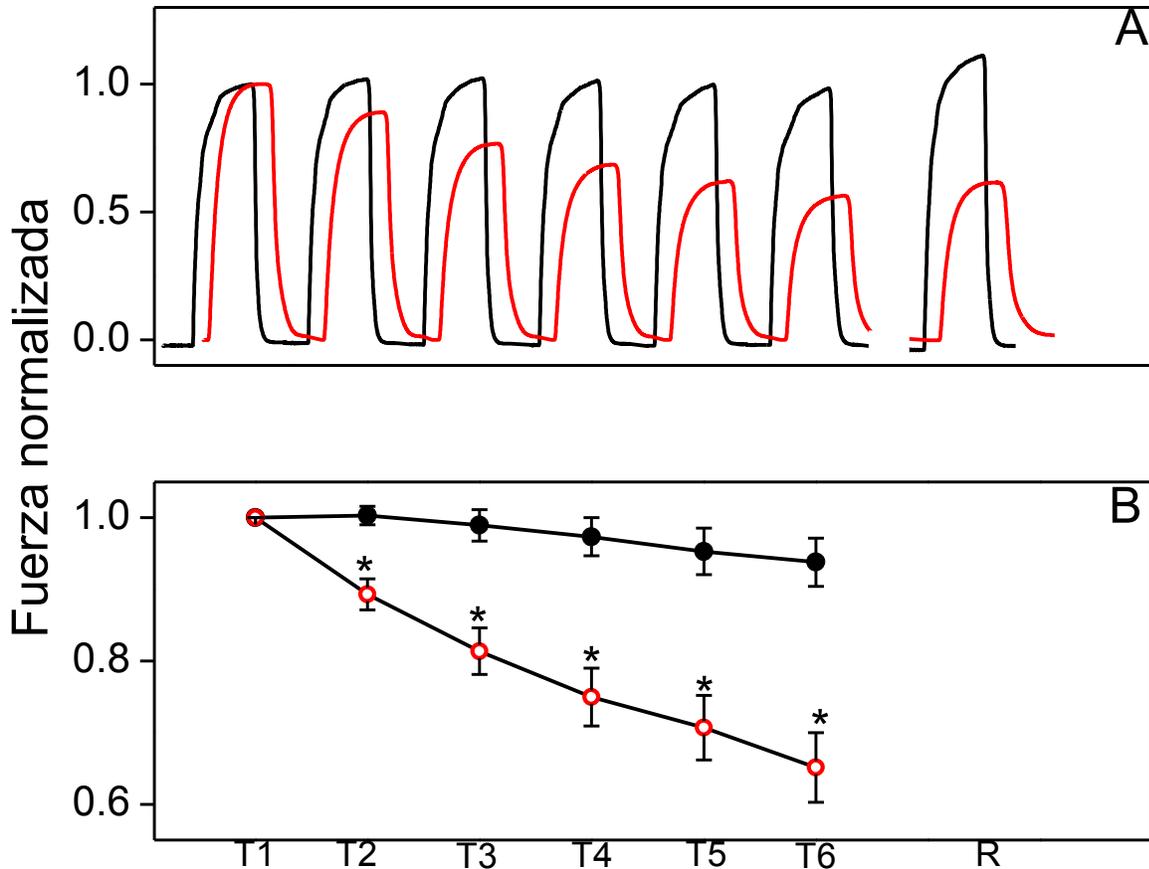


Figura 3.6. Efecto del *Carazolol* 30 μ M sobre la fatiga del músculo *Soleus*. En el panel A se muestra un esquema representativo del protocolo de fatiga y del tétanos de recuperación para el músculo control (línea negra) y para el tratado (línea roja). En el panel B observamos el efecto del *Carazolol* sobre la fatiga del músculo *Soleus*; Control (●) n=5, tratado (○) n=10. Pruebas utilizadas: U de Man-Whitney y Kruskal-Wallis. Las barras representan el error estándar. * $p < 0.05$

4.2.3 Recuperación del *Soleus*

Cuando comparamos al primer tétanos de la fatiga con respecto al primero de la recuperación, encontramos que la fuerza del músculo *Soleus* incubado con *Carazolol*

disminuía en un 25% (Figura 3.7 panel A). Sin embargo, cuando comparamos el último tétanos de la fatiga con respecto al primero de la recuperación, no encontramos diferencia significativa entre los músculos controles y los tratados (Figura 3.7 panel B).

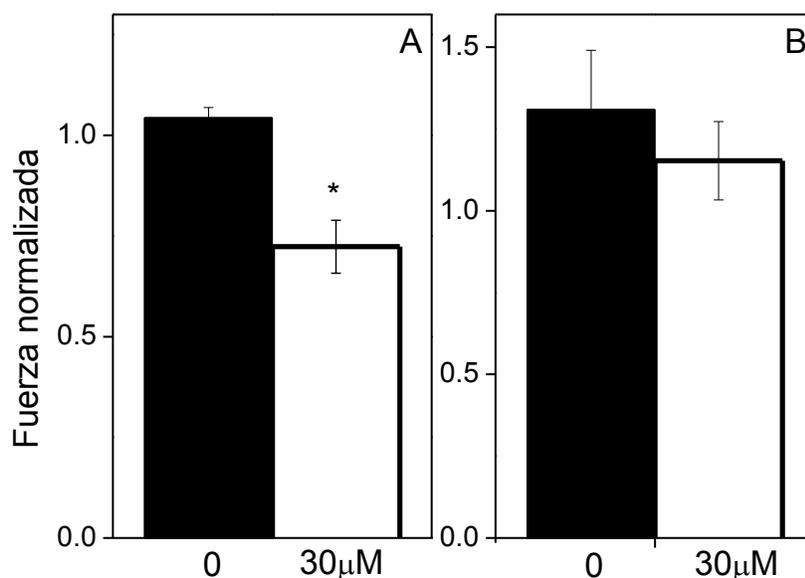


Figura 3.7. Fuerza de recuperación del músculo Soleus. En el panel A se muestra la fuerza con respecto al tétanos inicial de la fatiga. En el panel B se muestra la fuerza con respecto al último tétanos de la fatiga. Control (●) n=5, tratado (○) n=5. Pruebas utilizadas: U de Man-Whitney y Kruskal-Wallis. Las barras representan el error estándar. *p<0.05

4.2.4 Desvanecimiento del Soleus

Cuando se analizó el desvanecimiento de la fuerza de los tétanos durante el protocolo de fatiga, no se encontró diferencia en la forma de la curva de los músculos tratados con respecto a los controles (Figura 3.8 Panel A). Tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa entre controles y tratados cuando se analizó el desvanecimiento de la fuerza de los tétanos en cada uno de los tétanos del protocolo de fatiga (Figura 3.8 Panel B).

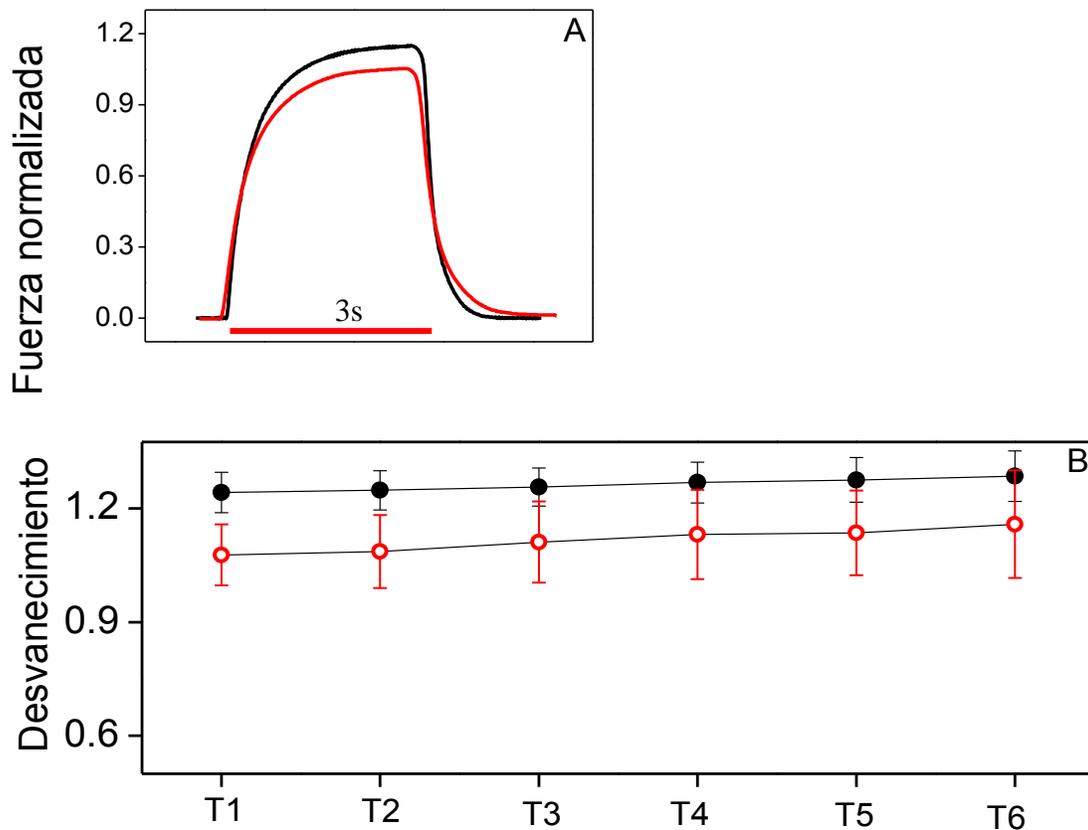


Figura 3.8. Efecto del Carazolol sobre el desvanecimiento del músculo Soleus. En el panel A se muestran registros representativos del músculo control (línea sólida) y del músculo tratado (línea punteada). En el panel B se muestra el efecto del desvanecimiento a lo largo del protocolo de fatiga; control (●), tratado (○). Pruebas utilizadas: U de Man-Whitney y Kruskal-Wallis. Las barras representan el error estándar. $P > 0.05$

5. Discusión de resultados

Es importante destacar que este estudio hasta el momento tiene un alcance correlativo, por lo cual, los resultados obtenidos no nos permiten asegurar el mecanismo de acción del Carazolol. Debido a esto la discusión se hará proponiendo algunos mecanismos de acción del Carazolol sobre los tipos de músculo estudiados.

Los resultados de fatiga de ambos tipos musculares se discutirán en el apartado 5.1, mientras que los resultados de recuperación y desvanecimiento se harán por separado para el músculo de contracción rápida (apartado 5.2) y para el músculo de contracción lenta (apartado 5.3).

5.1 *Fatiga*

El incremento en la fatiga de los dos tipos de músculos tratados con *Carazolol*, a una dosis de 30µM, nos permite pensar en que el aumento en la fatiga de ambos tipos de músculos puede ser consecuencia de la alteración de alguno de los siguientes mecanismos celulares:

- Proteínas regulatorias de la concentración de Ca^{2+} . El *Carazolol* puede estar modificando la actividad de estas proteínas, gracias a alguna de sus cascadas de señalización. La modificación de la afinidad de dichas proteínas por el Ca^{2+} puede estar jugando un papel importante en la fatiga del músculo esquelético. Tal es el caso de las proteínas descritas en la sección 1.1.5

Si el *Carazolol*, en el músculo de contracción rápida, modifica a la proteína Sarcalumenina (gracias a la fosforilación por PKA u otra proteína con acción similar) esta hará más estable a SERCA1 disminuyendo la cantidad de Ca^{2+} disponible en citoplasma; lo que disminuirá la cantidad de iones Ca^{2+} que se unirán a las proteínas de la maquinaria contráctil, generando disminuyendo la tensión generada en cada estímulo consecutivo. Este resultado correlacionaría con la disminución del desvanecimiento de dicho músculo pero no correlacionaría con que también se

observa una mayor fatiga en el músculo *Soleus*; por lo que, probablemente la fatiga del músculo *Soleus* se debe a otro de los mecanismos propuestos.

- Proteínas de la maquinaria contráctil. Al unirse a su receptor adrenérgico el *Carazolol* puede estar activando alguna de las vías de señalización asociadas a los receptores adrenérgicos tipo β_3 ; seguramente activando a proteínas que fosforilan a otras como la PKA, activándolas. Estas proteínas, podrían tener un efecto sobre alguna de las proteínas involucradas en la maquinaria contráctil, haciéndola menos reactiva al siguiente estímulo o disminuyendo su disponibilidad conforme se dan nuevos estímulos. Esta modificación podría ser de manera directa o indirecta, dependiendo de si fosforilan directamente a la proteína de la maquinaria contráctil o a otra que actúe sobre ella.
- Modificación del metabolismo. El *Carazolol* puede modificar la capacidad glucolítica de los músculos y así, desviarlos hacia una obtención de energía por la vía de la fermentación láctica. Aunque esto podría relacionarse con resultados en los que el *Carazolol* cambia el metabolismo durante largos periodos de administración (Valderrama 2009), en el presente caso el efecto se daría rápidamente ya que los músculos sólo están en contacto con el *Carazolol* por 10 minutos. La manera en la que se podría modificar el metabolismo en tan poco tiempo sería por medio de la fosforilación de enzimas de las vías metabólicas, modificando sus propiedades bioquímicas.

Además de todas estas propuestas, el *Carazolol* puede estar ejerciendo su efecto a través de un sin número de procesos celulares mediados por la activación de los receptores β_3 que, hasta el momento están poco descritos.

Es importante resaltar que el *Carazolol* a la dosis utilizada, logra fatigar al músculo *Soleus*, que en condiciones normales no se fatiga; sin embargo esto es independiente de la forma del tétanos, por lo que podríamos pensar que este efecto tiene que ver más con el metabolismo muscular o con las proteínas de la maquinaria contráctil que con las proteínas regulatorias del Ca^{2+} . Es posible que el *Carazolol* esté modificando el metabolismo oxidativo del músculo de contracción lenta, disminuyéndolo o interfiriendo con él de alguna manera y que esté haciendo más eficiente el metabolismo fermentativo del músculo de contracción rápida.

Los resultados observados por Valderrama no son comparables con la fatiga que se describe en esta tesis, ya que los primeros provienen de observaciones hechas a nivel sistémico y por un periodo prolongado de tiempo, mientras que el estudio presente es de un solo músculo y en un periodo de incubación corto de 10 minutos.

5.2 Músculo EDL

5.2.1 Recuperación EDL

Si tomamos como referencia el primer tétanos de la fatiga, el músculo EDL tratado con *Carazolol* recupera un 10% menos de la fuerza total que el músculo control. Sin embargo hay que considerar que los músculos en las dos condiciones parten de un grado de fatiga diferente. Cuando consideramos esta fuerza perdida por ambos tipos musculares,

observamos que el músculo tratado con *Carazolol* recupera un 30% más de la *fuerza perdida*, que el músculo control. Este efecto del aumento de la recuperación a mayor fuerza perdida sería notorio en aquellos estímulos donde el músculo se esfuerza al máximo, es decir tiene una gran fatiga; por ejemplo en carreras con salto o en carreras de velocidad de corta duración. Tal es el caso de los caballos deportivos reportados por Valderrama en 2009. Por lo tanto podríamos decir que aunque los músculos se fatigan más tienen un mejor rendimiento en cuanto a la recuperación de la fuerza perdida cuando se aplica *Carazolol* 30µM de manera aguda.

Es posible que la medida de comparación no sea la adecuada debido a que ambos tipos musculares parten de un grado de fatiga diferente. Sin embargo podría hacerse un estudio en donde se fatiguen los músculos control al mismo grado que los tratados y se compare su recuperación en esas condiciones.

También es posible que lo que se modifique sea alguna de las vías metabólicas activas en ese momento; aumentando su capacidad glucolítica al momento de la recuperación o las proteínas reguladoras del Ca^{2+} antes mencionadas.

5.2.2 Desvanecimiento EDL

El aumento en el desvanecimiento de la curva de los músculos EDL, la disminución de este parámetro en los músculos tratados, nos hace pensar que los mecanismos de regulación del Ca^{2+} pueden estar modificados. Debido al tiempo de la contracción, las proteínas encargadas de su liberación o reabsorción pueden ser las responsables de modificar la forma de la curva. Toda la fase de incremento de la fuerza mientras se

mantiene el estímulo, refleja la liberación del Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y está regulada por la proteína RyR. La fase que corresponde, en sí al desvanecimiento, comienza con la activación de SERCA y refleja la lucha que existe entre la continua liberación del Ca^{2+} y la reintroducción de éste al RS por medio de la proteína SERCA. Cuando se termina el estímulo eléctrico, la proteína RyR se inactiva y la proteína SERCA reintroduce todo el Ca^{2+} al retículo sarcoplásmico terminando la contracción (Figura 4.1).

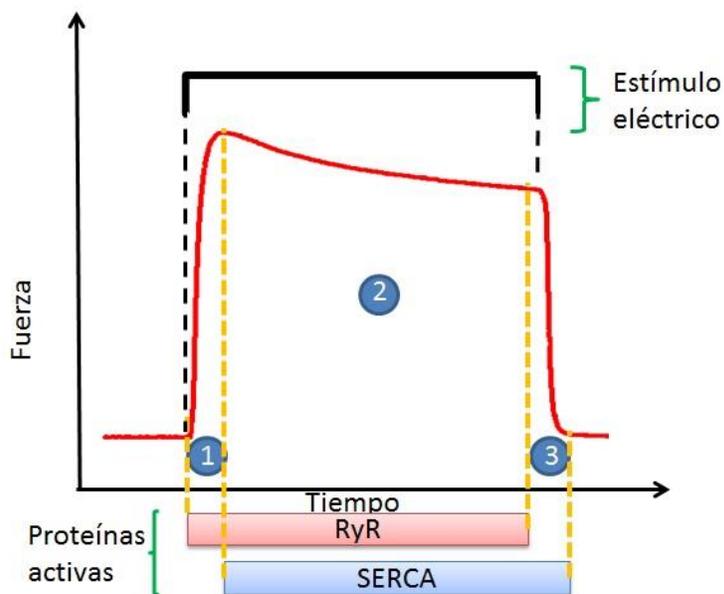


Figura 4.1 Proteínas responsables de la forma del tétanos. 1: La proteína RyR libera el Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y el músculo genera fuerza de contracción. 2: mientras la proteína RyR sigue liberando el Ca^{2+} , la proteína SERCA comienza a reintroducir el Ca^{2+} al retículo sarcoplásmico; entonces el músculo EDL pierde parcialmente la tensión. 3: el estímulo se termina, la proteína RyR deja de trabajar y la proteína SERCA reintroduce el Ca^{2+} terminando la contracción.

Estudios preliminares sobre la actividad de ATPasa de la proteína SERCA1 realizados en el laboratorio parecen indicar que la velocidad de hidrólisis de ATP no se ve modificada cuando el músculo es incubado con Carazolol; sin embargo, se requiere realizar más experimentos al respecto para corroborar esto.

Debido al cambio en el desvanecimiento de este músculo podríamos pensar que el *Carazolol* está afectando el comportamiento de la proteína SERCA₁ a través de la activación de la Sarcalumenina o de la Sarcolipina. Cualquiera de estos dos efectos volvería a SERCA₁ más veloz y de esta manera haría que el músculo tratado perdiera mayor tensión gracias a que esta proteína introduce más Ca²⁺ al RS del que RyR está sacando.

Si los resultados de cambio de la pendiente son debidos al efecto del *Carazolol* sobre los receptores adrenérgicos β₃, el efecto parece estar potenciado conforme pasa más tiempo. En los últimos tétanos el desvanecimiento se hace muy negativo. Esto puede estar mediado por un aumento de la translocación del receptor β₃ a la membrana. Sería interesante medir la cantidad de receptor en la membrana del músculo *Soleus* y el músculo EDL a diferentes grados de fatiga.

5.3 *Músculo Soleus*

5.3.1 Recuperación del músculo *Soleus*

Aunque el músculo tratado con *Carazolol* no recupera el 100% de su fuerza inicial, al hacer el análisis de la fuerza recuperada con respecto a la perdida, observamos que tanto el músculo control como el tratado recuperan el mismo porcentaje de fuerza. Este último resultado no es de una gran magnitud puesto que, normalmente el músculo *Soleus* no se fatiga con este protocolo; por lo que no necesita recuperar su fuerza.

Al igual que para el músculo EDL para aseverar esta diferencia se debería de realizar un estudio en el cual los músculos en ambos tipos de condiciones sean sometidos al mismo grado de fatiga y, a partir de ahí, se mida su recuperación.

5.3.2 Desvanecimiento músculo *Soleus*

Es interesante resaltar que el *Carazolol* no tuvo un efecto sobre el desvanecimiento de del músculo *Soleus*, mientras que sí lo tuvo sobre el músculo EDL. Esto puede estar dado también por las diferentes proteínas reguladoras del Ca^{2+} que tienen ambos músculos. En el caso del EDL el *Carazolol* pudo haber activado a Sarcalumenina o a Sarcoplipina; sin embargo este efecto no lo tiene sobre proteínas como PLN. Si el *Carazolol* está modificando las propiedades de estas enzimas lo está haciendo de manera selectiva para el músculo EDL.

6. Conclusiones

Gracias a lo estudiado en este trabajo podemos afirmar que el *Carazolol*, a una dosis de $30\mu\text{M}$, aplicado *in vitro* a un músculo aislado, modifica sus propiedades mecánicas. Dentro de estas modificaciones podemos decir que el *Carazolol* es capaz de fatigar tanto al músculo lento como al rápido; siendo de gran importancia la fatiga del músculo lento ya que en condiciones normales este tipo de músculo es menos propenso a la fatiga, lo que significaría que el mecanismo de protección del músculo lento a la fatiga (mecanismo desarrollado durante la diferenciación celular de las fibras) se pierde a través de algún

mecanismo modificado por alguna de las proteínas de la cascada de señalización de los receptores adrenérgicos tipo β_3 .

Por otro lado, el *Carazolol* es responsable de que los músculos no recuperen su fuerza inicial después de 20 minutos de reposo, sin embargo el músculo rápido recupera más la fuerza perdida cuando es tratado con *Carazolol* y el músculo *Soleus* recupera la misma proporción que el músculo control. Los posibles mecanismos de acción de esta droga involucran enzimas de la cascada de señalización de los adrenoceptores tipo β_3 (de la cual se conoce poco) que podrían estar afectando a un sin número de proteínas involucradas en la contracción muscular. Entre estas proteínas hay que destacar a las proteínas regulatorias del flujo del Ca^{2+} , que parecen estar modificadas en el músculo de contracción rápida incubado con *Carazolol* $30\mu\text{M}$. En cuanto al cambio que se observó en el desvanecimiento del músculo EDL se propone que el *Carazolol* puede estar afectando, por medio de alguna cascada de señalización, la actividad de la proteína encargada de recapturar el Ca^{2+} sarcoplásmico: la isoforma tipo1 de la SERCA. Este efecto puede estar dado por una fosforilación de Sarcalumenina mediada por PKA. En el caso del músculo *Soleus* no hay un efecto sobre la SERCA2 durante la estimulación tetánica, por lo que se sugiere que el mecanismo involucrado en la regulación de SERCA2 no esté activo; es decir, que proteínas como PLN no se alteren por efecto del *Carazolol*.

Debido al poco conocimiento que existe sobre las causas de la fatiga muscular, esta droga puede ser utilizada como herramienta para aportar conocimiento al tema de la fisiología del ejercicio.

Referencias

1. Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 153: 586–600, 1948.
2. Anthony A, Bahl AK, Oakley IG, Spraggs CF, Dhillon AP, Trevethick MA. The β_3 -adrenoceptor agonist CL 316243 prevents indomethacin-induced jejunal laceration in the rat by reversing early villous shortening. *J. Pathol.* 179:340–46. 1996.
3. Arch JRS, Ainsworth AT, Ellis RDM, Piercy V, Thody VE, et al. Treatment of obesity with thermogenic β -adrenoceptor agonists: studies on BRL 26830A in rodents. *Int. J. Obesity* 8:1–11. 1984.
4. Arch JRS, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennit MV, et al. Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* 309:163–65. 1984.
5. Arch, J.R.S, Ainsworth A.T, Cawthorne, M.A, Piercy, V, Sennit, M.V, Thody, V, Wilson, C & Wilson, S. Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for antiobesity drugs. *Nature*, 309, 163-165. 1984.
6. Ashmore C. R & Doerr L. Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Experimental neurology*, 31,408-418. 1971.
7. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobiessi ZA, et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*. 416:337-339. 2002.
8. Biel Andrew. *Trail guide to the body*. Fourth edition. Edit. Books of discovery. Boulder CO, 2010.
9. Board M, Doyle P, Cawthorne MA. BRL37344, but not CGP12177 stimulates fuel oxidation by soleus muscle *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* 406:33-40. 2000.
10. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN,

- Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294: 1704–1708, 2001.
11. Brittsan AG, Kranias EG: Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol*; 32: 2131-2139, 2000.
 12. Choo JJ, Horan MA, Little RA, Rothwell NJ. Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by β_2 -adrenoceptor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 263: E50–E56, 1992.
 13. Costello B, Chadwick C, Saito A, Chu A, Maurer A, Fleischer S. Characterization of the junctional face membrane from terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum. *J Cell Biol*;103:741–753. 1986.
 14. Costin B, O'Donnell SR, Wanstall JC. A comparison of the selectivity of carazolol with that of other beta 2-selective adrenoceptor antagonists. *J Pharm Pharmacol. Sep*;35(9):590. 1983
 15. Durrant M. L, Garrow J.S, Royston P, Stalley S. F, Sunkin S, Warwick P. M. Factors influencing the composition of the weight lost by obese patients on a reducing diet. *Br. J. Nutr.* 44(3):275-85. 1980.
 16. Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ, Winter PD. Chronic effects of β_2 -adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci Rep* 4: 83–91, 1984.
 17. Emorine L.J, Marullo S, Briend-sutren, M.M, Patey G, Tate K, Delarier-klutchko C & Strosberg A.D. Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science*, 245, 1118-1121. 1989.
 18. Ennion S, Sant'Ana J, J Anthony, Young A, & Goldspink G. Characterization of human skeletal muscle fibres according to the myosin heavy chains they express. *Journal of muscle research and cell motility* 16, 35-43. 1995.
 19. Fisher M. H, Amend A. M, Bach T. J, Barker J. M, *et al.* A selective human β_3 adrenergic receptor: New pharmacological profile and mechanism of activation. *Mol. Pharmacol.* 55:255-62. 1999.

20. Francis SH, Turko IV, Corbin JD. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 65: 1–52, 2001.
21. García-Pelagio KP, Bloch RJ, Ortega A, González-Serratos H: Biomechanics of the sarcolemma and costameres in single skeletal muscle fibres from normal and dystrophin-null mice. *J Muscle Res Cell Motil* 2011;31:323–336.
22. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Lemarec H. Functional β_3 -adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest.* 98:556–62. 1996.
23. Gerhardt C, Gros J, Strosberg A.D, Isaad T. Stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by human beta-3 adrenergic receptor: new pharmacological profile and mechanism of activation. *Molecular pharmacology.* 55:255-262. 1999
24. Gregorevic P, Williams DA, Lynch GS. Effects of leukemia inhibitory factor on rat skeletal muscles are modulated by clenbuterol. *Muscle Nerve* 25: 194–201, 2002.
25. Hinkle RT, Hodge KM, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK, Isfort RJ. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the β_2 -adrenergic receptor. *Muscle Nerve* 25: 729–734, 2002.
26. Innis RB, Correa FM, Synder SH. Carazolol, an extremely potent beta-aderenergic blocker: binding to beta receptors in brain membranes. *Life Sci Jun* 11;24(24):2255-64. 1979
27. Ishii T, Sunami O, Saitoh N, Nishio H, Takeuchi T, Hata F. Inhibition of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by nitric oxide. *FEBS Lett*;440:218 – 222, 1998.
28. Jesús Vega-Moreno, Aldo Tirado-Cortes, Rocío Álvarez, Claudine Irlles, Jaime Mas-Oliva and Alicia Ortega. Cholesterol Depletion Uncouples β -dystroglycans from Discrete Sarcolemmal Domains, Reducing the Mechanical Activity of Skeletal *Muscle Cell Physiol Biochem* 2012;29:905-918
29. Kim YS, Sainz RD, Molenaar P, Summers RJ. Characterization of β_1 - and β_2 -adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochem Pharmacol* 42: 1783–1789, 1991.

30. Kirchberger MA, Tada M, Katz AM. Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1974; 249: 6166– 6173.
31. Lefaucheur L, Ecolan P, Plantard L, Guequen N. New insights into muscle fiber types in the pig. *J histochem Cytochem*, May; 50(5):719-30. 2002.
32. Lohse MJ. G-proteins and their regulators. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360: 3–4, 1999.
33. López Rivero J. Patrones morfométricos e histoquímicos de la población fibrilar del músculo glúteo medio del caballo en razas de diferentes aptitudes. Tesis de doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba España. 1988.
34. Lynch Gordon S. & Ryall James G. Role of Adrenoceptor Signaling in Skeletal Muscle: Implications for Muscle Wasting and Disease, *Physiol Rev* 88: 729–767, 2008.
35. MacLennan DH, Kranias EG: Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 566-577.
36. MacLennan DH, Yip WH, Iles GH, Seeman P. Isolation of sarcoplasmic reticulum proteins. *Cold Spring Harbor Symp Quant*;37:469–478, 1972.
37. Medina J. Propiedades mecánicas del musculo esquelético en presencia de un agente inotrópico terapéutico y en un modelo de distrofia en murinos. Tesis de maestría. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. 2010
38. Méjean A, Guillaume JL, Strosberg AD. Carazolol: a potent, selective beta 3-adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol*. Nov 30;291(3):359-66. 1995.
39. Miller J. W, Farid N. A, Johnson R. D, Smith B. P, Dananberg J, Stimulation of energy expenditure by LY377604, a beta 3-adrenergic receptor agonist with beta 1/2-antagonist properties, in healthy male subjects. *Obes. Res.* 7 (Suppl. 1), 121S. 1999.
40. Milligan G, Mullaney I, Kim GD, MacEwan D. Regulation of the stoichiometry of protein components of the stimulatory adenylyl cyclase cascade. *Adv Pharmacol* 42: 462–465, 1998.

41. Odermatt A, Becker S, Khanna VK, Kurzydowski K, Leisner E, Pette D, et al. Sarcolipin regulates the activity of SERCA₁, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem*;273:12360–12369, 1998.
42. Rattigan S, Appleby GJ, Edwards SJ, McKinstry WJ, Colquhoun EQ, Clark MG, Richter EA. α -Adrenergic receptors in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 1071–1077, 1986.
43. Rossi E. A & Dirksen R.T. Sarcoplasmic reticulum: The dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve* 33: 715-731, 2006.
44. Stock, M.J, & Sudera, D.K. Schild analysis of β -adrenoceptor antagonist inhibition of brown adipocyte respiratory response to novel β -adrenoceptor agonists. *British Journal of Pharmacology*, 96, 741P. 1989.
45. Strosberg A.D. Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:421-50. 1997
46. Tada M, Kirchberger MA, Repke DI, Katz AM. The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1974;249: 6174– 6180.
47. Tada M. Calcium cycling proteins of the cardiac sarcoplasmic reticulum. Molecular regulation of the phospholamban-SERCA Ca²⁺ pump system and its pathophysiological consequences. *Circ J* 2003; 67: 729-737.
48. Valderrama M.E. Efecto del Carazolol en el músculo esquelético del caballo del deporte. Tesis de maestría. Facultad de Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de México. 2009.
49. Warris P.D, Lister D. Improvement of meat quality in pigs by beta-adrenergic blockade. *Meat science.* 7(3):183-187. 1982.
50. Widmaier E.P, Raff H, Strang T.K, *Vander's human physiology: the mechanisms of body function*. Edit. McGraw-Hill, USA, 2001.
51. William F. Ganong. *Fisiología médica*. Edit. Mac Graw-Hill. Madrid, España. 2000.

52. Yong-Ling Liu & Michael J. Stock. Acute effects of the β_3 adrenoceptor agonist, BRL 35135, on tissue glucose utilization. *British Journal of Pharmacology* 114, 888-894. 1995.
53. Yoshida M, Minamisawa S, Shimura M, Komazaki S, Kume H, Zhang M, et al. Impaired Ca²⁺ store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcoplumenin-deficient mice. *J Biol Chem*; 280:3500–3506, 2005.
54. Zarain-Herzberg A. Reyes-Juárez JL. Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. *Archivos de cardiología de México*; 76(4) 18-32. 2006.
55. Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor: proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*; 272:23389–23397, 1997.