



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA



UN MODELO REDOX DE FATIGA: ÁCIDO LIPOICO,
DITIOIOL CELULAR IMPLICADO EN LA
RECUPERACIÓN DE LA FATIGA MUSCULAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA

PRESENTA:

JULIÁN BRYCE URIARTE ORTIZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ALICIA ORTEGA AGUILAR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2019



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.

Índice

Agradecimientos.....	4
Índice de abreviaturas.....	6
Resumen	7
Abstract	8
Reseña del estudio.....	9
1. Introducción	11
1.1 Estructura del músculo	11
1.2 Acople excitación-contracción (e-c)	14
1.3 Tipos de fibras.....	16
1.4 Hipótesis sobre la fatiga	17
1.4.1 Fatiga por acumulación de lactato.....	17
1.4.2 Fatiga por acumulación de P_i	18
1.4.3 Estado de óxido-reducción en el músculo.....	18
1.5 Antioxidantes	20
2. Objetivo.....	22
3. Hipótesis.....	22

4. Materiales y métodos	23
4.1 Animales.....	23
4.2 Materiales	23
4.3 Preparación de músculo	23
4.4 Protocolo de estimulación	24
4.5 Análisis estadístico.....	26
5. Resultados	28
5.1 Contracción del músculo esquelético en presencia de óxido de fenilarsina (PAO).....	28
5.2 Pérdida de la fuerza de contracción por PAO, BAL, GSH y α -AL	30
5.3 Recuperación de la fuerza de contracción por PAO, BAL, GSH y α -AL.....	32
5.4 Recuperación de la fuerza de contracción posterior al tren de estimulación	34
5.5 Efecto del PAO, BAL, GSH y α -AL sobre la fatiga	36
6. Discusión.....	37
6.1 Efecto del PAO sobre la fuerza de contracción.....	37
6.2 Efecto del BAL sobre la recuperación de la fatiga	39
6.3 Efecto del glutatión sobre la recuperación de la fatiga	40
6.4 Efecto del α -AL sobre la recuperación de la fatiga.....	41

6.5 El α -AL acentúa la fatiga en ausencia de PAO en el músculo rápido 42

7. Perspectivas 44

8. Resumen gráfico..... 46

9. Conclusiones 48

10. Referencias 50

Agradecimientos

Este trabajo representa no sólo el término de mis estudios universitarios sino la culminación de más de 16 años en instituciones educativas adquiriendo conocimiento y forjándome en quién soy ahora.

Un camino largo que va más allá del tiempo y durante el cual me encontré con personas maravillosas que me fueron guiando y enseñando en el proceso. Esto es para todas aquellas personas que me apoyaron y llevaron hacia adelante.

Primero quiero agradecer a mi familia, en particular a mi mamá, Ana, mi hermano, Rodrigo, y a mi abuela, Zoila; por ser mis pilares y proveerme de cariño y enseñanzas fuera del aula y el laboratorio. Agradezco inmensamente a José Méndez por su apoyo, pues sin él, no hubiera llegado a donde estoy. También le agradezco a mis amigos por ser una fuente de motivación y de momentos entrañables. En particular le agradezco a mi novia Luz, al ser mi pilar y una mira que nunca me dejó perder mi objetivo.

En el plano científico, me debo a las personas que me instruyeron en la ciencia, siempre de una manera humana y amable. Gracias a ellos logro terminar esta aventura y los nombro en el orden en que los conocí: Biólogo Rubén Morelos Ramírez, Dra. Alicia Ortega Aguilar, QFB Rocío Álvarez Medina, Dr. Fidel Ramón Romero y Dra. Carolina Escobar Briones. Todos me enseñaron distintas caras de la ciencia, pero el común denominador fue el compromiso y tacto con el que la trataban todos los días.

Este estudio fue apoyado por DGAPA IN218215 (Dirección General del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)), y otorgado a la Dra.

Alicia Ortega Aguilar. Fui apoyado durante mi Tesis de Licenciatura por DGAPA. Reconocemos con gratitud al Dr. Enrique Pinzón-Estrada y al Dr. Ismael Torres-Saldaña de la Facultad de Medicina de la UNAM por su colaboración en las facilidades de cuidado y cría de animales, sin su contribución nuestro trabajo no hubiese sido posible

Índice de abreviaturas

α-AL	Ácido α -Lipoico
ACh	Acetilcolina
BAL	British Anti-Lewisite / 2,3-Dimercaptopropanol
CT	Cisterna terminal
Cys	Cisteína
DHLA	Ácido dihidrolipoico
e-c	Ciclo excitación-contracción
EDL	<i>Extensor Digitorum Longus</i>
FL	Fibras musculares lentas o tipo I
FR	Fibras musculares rápidas o tipo II
GSH	Glutación reducido
GSSG	Disulfuro de glutación
IL	Músculo incubado solamente con DHLA
IP	Músculo incubado solamente con PAO
IPB	Músculo incubado con PAO y posteriormente con BAL
IPG	Músculo incubado con PAO y posteriormente con GSH
IPL	Músculo incubado con PAO y posteriormente con DHLA
PAO	Óxido de fenilarsina
Redox	Óxido-reducción
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RS	Retículo sarcoplásmico
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarco (endo)plásmico
TT	Túbulos transversos
VTGs	Grupos tioles vecinales

Resumen

La fatiga muscular es un fenómeno fisiológico reversible que se desarrolla tras una actividad prolongada del músculo. El mecanismo molecular de la fatiga aún no ha sido evidenciado convincentemente. Una de las hipótesis que busca explicarlo, es a través del efecto de la óxido-reducción (redox) de las proteínas de la maquinaria contráctil y/o proteínas reguladoras de calcio. En este estudio, nos hemos enfocado en el papel que tienen las oxidaciones reversibles del motivo proteico Cys-X_{n=2-6}-Cys (tiol-vecinal) en proteínas reguladoras de calcio y su efecto en el ciclo excitación-contracción (e-c). En trabajos anteriores se ha demostrado que compuestos no biológicos como el ditiol 2,3-dimercaptopropanol (BAL), logra revertir la fatiga, por lo que buscamos a la molécula que se encuentre en condiciones fisiológicas y que tenga un efecto similar. Se utilizaron dos moléculas reductoras de Cys; Glutación (GSH) y Ácido α -Lipoico (α -AL), un monotiol y un ditiol respectivamente. El primero es un amortiguador redox abundante en la célula mientras que el segundo es un ditiol fisiológico con funciones antioxidantes. Evaluamos la capacidad de ambos para revertir la fatiga en músculos lentos y rápidos aislados de rata, utilizando un protocolo de estimulación eléctrica prolongada, en presencia y ausencia de un agente oxidante específico de tioles vecinales, el Óxido de Fenilarsina (PAO). Los datos indican que el GSH no tiene efecto sobre la reversión de la fatiga mientras que el α -AL está implicado en este fenómeno. Por lo tanto, en el modelo de proteínas con tioles vecinales que participan en el mecanismo molecular de la fatiga, el efecto del ditiol α -AL y no del monotiol GSH es un indicador de la importancia de los tioles vecinales en este fenómeno. Aunque es importante destacar que, si bien el α -AL puede revertir el efecto del PAO sobre la fatiga, no es el antioxidante tiol vecinal específico que regula el proceso in vivo.

Abstract

Muscle fatigue is a physiological phenomenon that protects itself after prolonged muscle activity, particularly in fast skeletal muscle. The molecular mechanism underlying fatigue is not fully understood yet. One of the hypotheses that tries to explain it, is the oxidation-reduction (redox) hypothesis. This hypothesis, among other variables, explores the importance of reversible oxidations of vicinal thiols in several key proteins that are involved in the regulation of calcium and its effect in the contraction cycle of muscle. In previous studies it has been proven that non-biological compounds such as 2,3-dimercaptopropanol (BAL), a dithiol, can reverse muscle fatigue, therefore we seek a physiological molecule that could have a similar effect. In order to achieve this, we used two possible molecules: Glutathione and Lipoic Acid, a monothiol and a dithiol respectively. The former is considered the most important and abundant redox buffer of the cell, while the latter is a physiological dithiol with several antioxidant properties. These molecules were tested in a prolonged stimulatory protocol to assess their ability to reverse skeletal muscle fatigue induced by electrical stimuli and accelerated by a specific oxidative agent of vicinal thiols, Phenyl arsine Oxide (PAO), in fast and slow isolated rat muscle. The data indicates that Glutathione does not have an effect in fatigue reversal. On the other hand, Lipoic acid is implicated in this phenomenon. Thus, in the vicinal thiol model, dithiols and not monothiols, are involved in the recovery from fatigue.

Reseña del estudio

El músculo esquelético es un órgano vital que nos permite la locomoción, el movimiento en todas sus expresiones desde la marcha habitual de todos los días hasta movimientos complejos expresados en las artes y en el deporte. Sólo nos limita nuestra imaginación y morfología. Sin embargo, otra limitante se asoma a nuestras actividades: en una persona que sale a correr por las mañanas, un atleta de alto rendimiento que va a un entrenamiento de fuerza o sencillamente una persona de la tercera edad que sube una escalera, experimentan fatiga. Este es un fenómeno intrínseco del músculo esquelético tras mantener la intensidad de cualquier actividad por un periodo prolongado y está caracterizado por la pérdida de fuerza aún cuando el estímulo que provoca la actividad muscular permanezca inalterado. Es decir, que por más que nos esforcemos e intentemos empujar, levantar o seguir moviéndonos, independientemente de la necesidad y el deseo, nuestros músculos simplemente no logran producir la misma fuerza ni la misma intensidad durante el esfuerzo, y la actividad se colapsa de manera transitoria, para recuperarse al 100% después de un período de reposo. Esto es una característica propia y natural del músculo, no debe confundirse con cansancio o falta de motivación, donde interviene el Sistema Nervioso. La fatiga ha sido descrita desde hace muchos años, pero aún no se conocen las moléculas que causan o que revierten este fenómeno. A través del tiempo se han planteado muchas hipótesis sin que logren explicarla completamente. Es así que nosotros buscamos alguna(s) de la(s) molécula(s) que se encarguen de revertir a la fatiga, lo que ayudaría a comprender mejor el mecanismo detrás de este y acercarnos a elucidar lo que pasa en nuestros músculos durante este fenómeno.

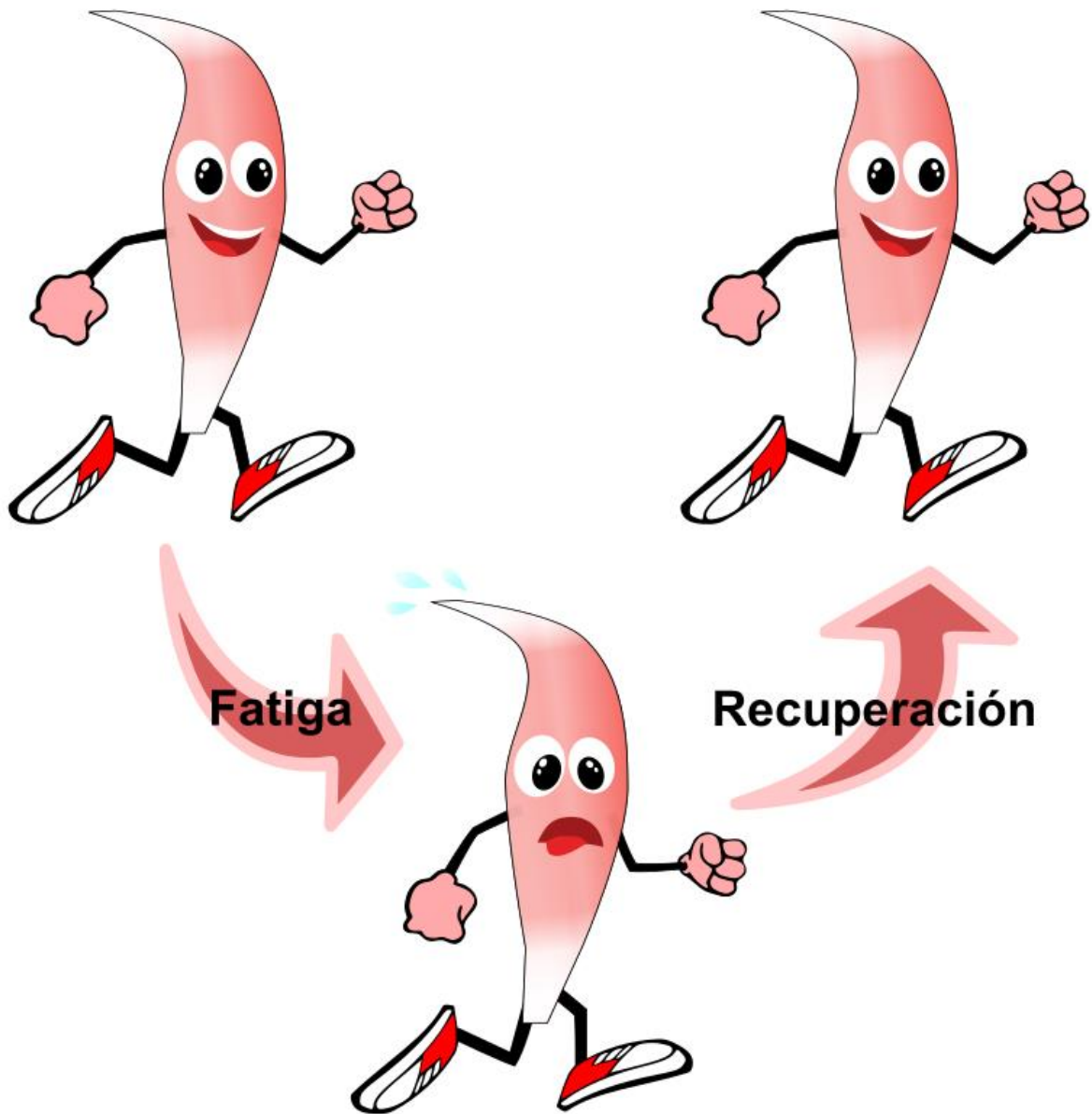


Fig 1. Representación del fenómeno de la fatiga. En este concepto, va implícita la recuperación.

1. Introducción

1.1 Estructura del músculo

El músculo es un tejido que constituye alrededor del 40% de la masa total de los vertebrados. Es el responsable de la locomoción, sirve como un almacén de proteínas y fuente de aminoácidos, contribuye al metabolismo sistémico al consumir glucosa de manera dependiente a la insulina durante el reposo, produce calor durante el movimiento¹, tiene una función propioceptiva y es considerado un órgano endócrino². Los músculos comparten no sólo funciones sino también estructura.

El músculo consiste en una serie de células o fibras musculares ubicadas de manera paralela y mantenidas juntas por tejido conectivo. La fibra muscular es una célula cilíndrica de 10-100 micrómetros de diámetro y longitud aproximada de 30 cm, donde el 95% de ellas van de tendón a tendón. Estas fibras se forman durante el desarrollo embrionario a partir de la fusión de células (sincicio) denominadas mioblastos, por lo que presentan miles de núcleos debajo de su membrana plasmática además de numerosas mitocondrias.

Las miofibrillas comprenden los elementos contráctiles especializados que constituyen el 80% del volumen de la fibra muscular. Una fibra muscular está constituida por miofibrillas, estructuras proteicas que se componen de actina (filamentos delgados) y miosina (filamentos gruesos), que se extienden a lo largo del eje longitudinal de la fibra. Vistas con un microscopio utilizando luz polarizada, las miofibrillas presentan bandas oscuras o anisotrópicas (Bandas A) y bandas claras o isotrópicas (Bandas I) que se alternan entre si (Figura 2). Las bandas A se componen de filamentos gruesos que se extienden por toda la banda y se superponen en ambos extremos a los filamentos delgados. La zona central de los filamentos gruesos, donde los filamentos delgados no alcanzan a éstos, se denomina zona H (del alemán Hell; claro).

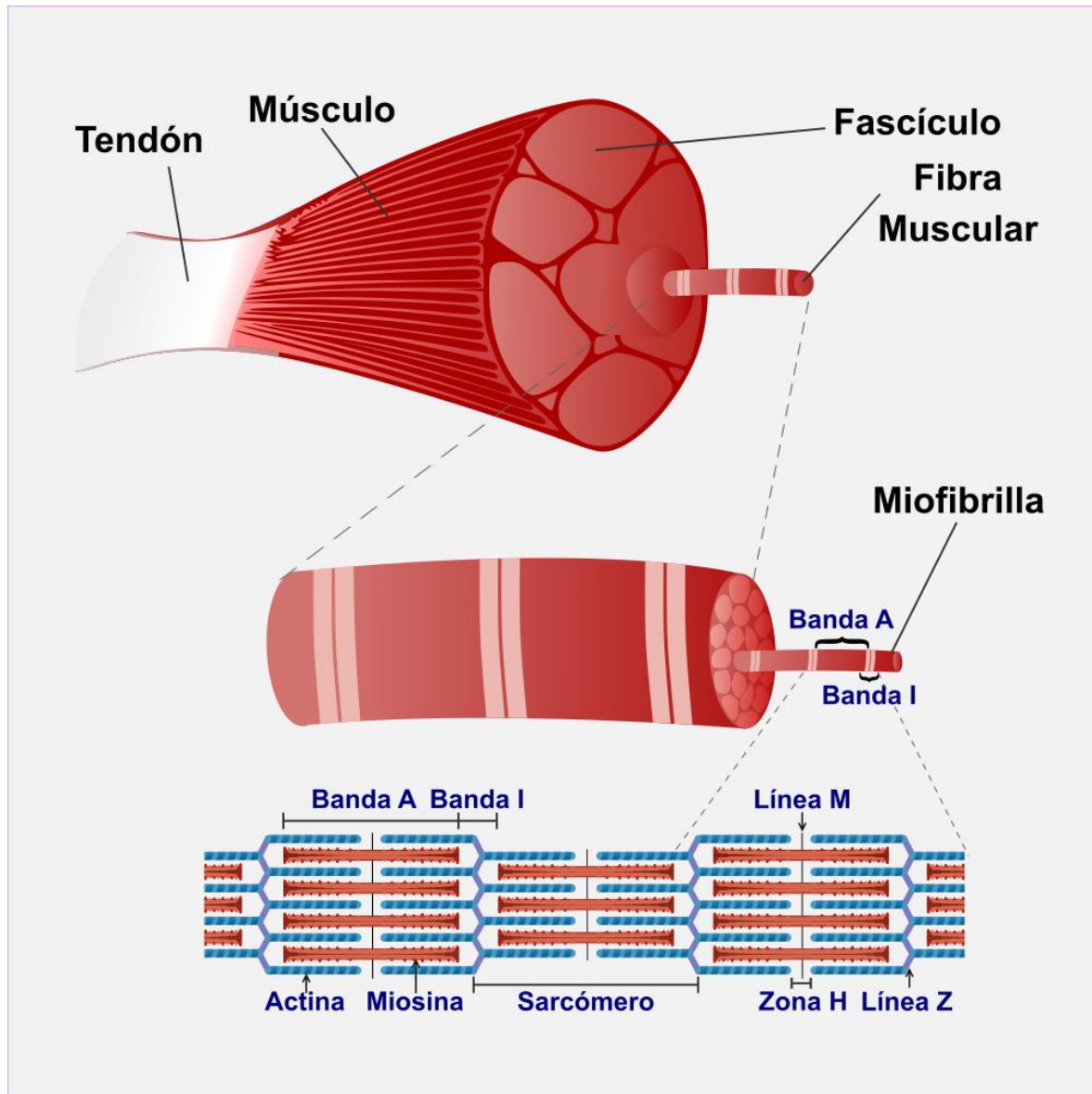


Fig 2. Estructura del músculo esquelético.

A la vez, en la región central de la zona H, se encuentra la línea M (del alemán Mittel; media), un soporte proteico para los filamentos gruesos que abarca verticalmente todo el grosor de la banda A. La titina, la proteína más grande del genoma, se extiende a partir de la línea M hasta la línea Z (del alemán Zwischen; entre) y sirve como un resorte involucrado en la contracción pasiva³.

La banda I es la porción restante de los filamentos delgados que no se proyectan dentro de la banda A. Dentro de esta banda se encuentra una línea vertical densa denominada línea Z, que es un arreglo

proteico que sirve para conectar los filamentos delgados a ambos lados de ésta. Las proteínas de la línea Z se conectan en el eje transversal, con las proteínas costaméricas y de la sarcolema para transmitir la fuerza de manera transversal de una célula muscular a otra y dar origen a la sumatoria de fuerza que termina en el aumento de la tensión del músculo³. El área entre dos líneas Z se denomina sarcómero y es la unidad funcional y estructural del músculo esquelético. De la longitud del sarcómero depende la fuerza de contracción⁴ (Figura 3).

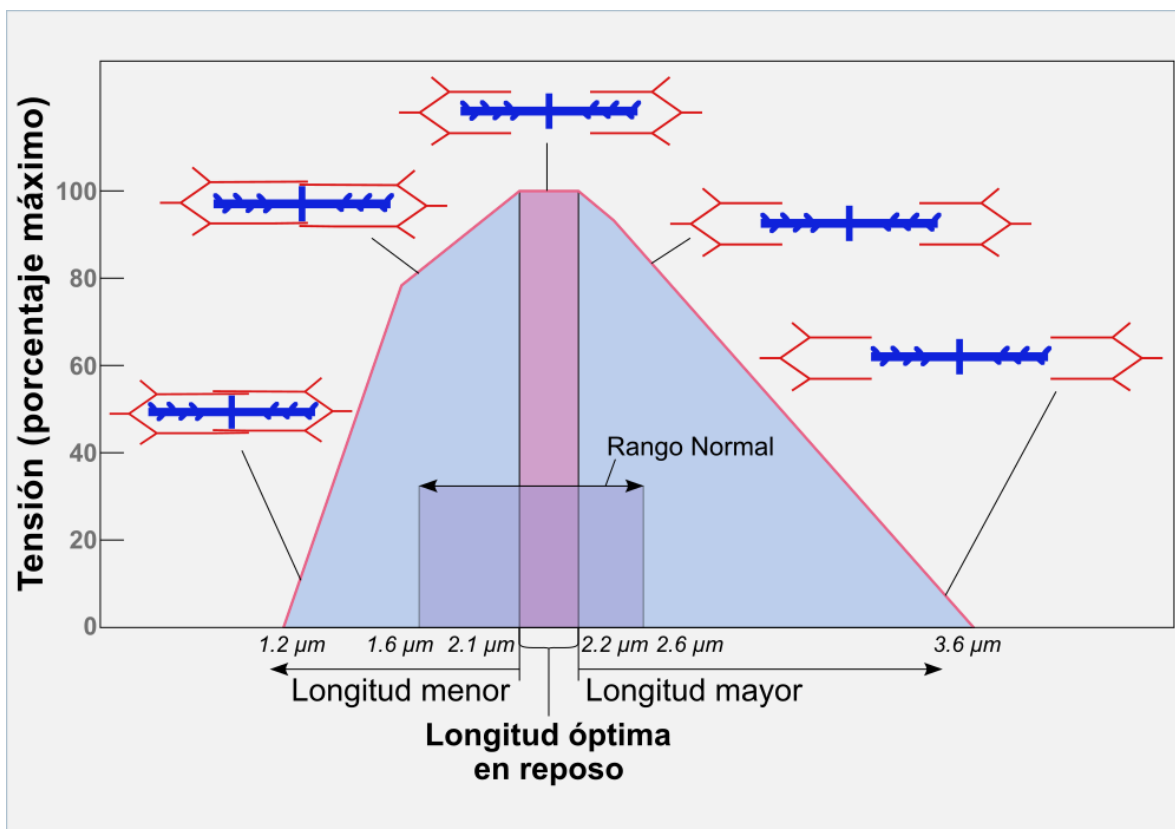


Fig 3. Relación entre la longitud del sarcómero y la generación de tensión. Se muestra el rango óptimo donde un sarcómero puede desarrollar su tensión máxima (2.1-2.2 micras). Si el músculo se encuentra a una longitud menor o es estirado en demasía, éste empieza a perder su capacidad de desarrollar tensión. Modificado de Martini, 2001.

Por último, la membrana plasmática de la fibra muscular (sarcolema) presenta invaginaciones regulares que cruzan a lo largo y ancho de la fibra denominadas Túbulos Transversos (TT). Adyacente

a los TT, dentro de la fibra, se encuentra una red membranosa llamada Retículo Sarcoplásmico (RS) que se encarga de almacenar el Ca^{2+} durante la relajación a través de la ATPasa de calcio (SERCA) y liberarlo durante la contracción. La porción más cercana del RS a los TT, se llama Cisterna Terminal (CT) y es la fracción membranosa que contiene a los Receptores de Ryanodina, canales de Ca^{2+} (Figura 4)⁵.

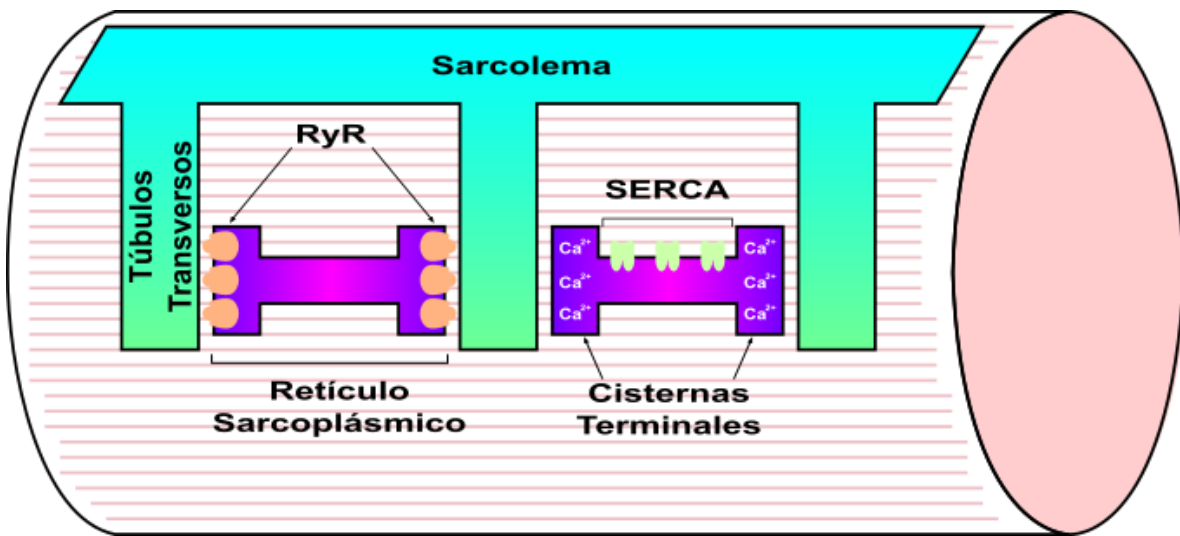


Fig 4. Representación esquemática de las membranas de la fibra muscular.

1.2 Acople excitación-contracción (e-c).

El mecanismo de acoplamiento e-c es la secuencia de eventos que ocurren desde la generación del potencial de acción en la fibra muscular hasta que se inicia la generación de tensión.

El músculo esquelético es estimulado para contraerse por la liberación de acetilcolina (ACh) de la motoneurona en la placa neuro-muscular. Esta ACh se une a su receptor (nicotínico) en la fibra muscular y provoca cambios en la permeabilidad de la fibra al activar canales de sodio,

desencadenando un potencial de acción que es conducido a lo largo de la fibra y hacia el interior de ésta por los TT.

Una vez que se despolarizan los TT, se activa el receptor de voltaje de dihidropiridina cuyo cambio conformacional induce una interacción proteína-proteína del canal de Ca^{2+} del Receptor de Rianodina (RyR), liberando Ca^{2+} masivamente de la cisterna terminal hacia el espacio miofibrilar. Este Ca^{2+} se une a la troponina, modificando su estructura y deslizando a la tropomiosina de su sitio de interacción con la actina, para liberar el sitio de unión de la actina a la miosina³.

La cabeza de la miosina presenta dos sitios de unión; un sitio de unión a actina y un sitio de unión a nucleótido con actividad de ATPasa. Antes de unirse la miosina a la actina, una molécula de ATP se une a la miosina. Una vez unido el Ca^{2+} a la troponina, se exponen los sitios de unión, de la actina a la miosina, uniéndose y formando puentes cruzados, generándose así la fuerza³. La generación de fuerza continúa en presencia de Ca^{2+} . Para que suceda la relajación el Ca^{2+} debe ser removido de los miofilamentos por la actividad enzimática de SERCA. Para separarse la miosina de la actina, se requiere la energía de ruptura del ATP unido a la miosina.

La ATPasa de calcio del retículo sarco (endo)plásmico (SERCA por sus siglas en inglés sarco (endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) está localizada en el RS y se encarga de bombear Ca^{2+} al interior del RS mediante la hidrólisis del ATP, con una estequiometría de 2 iones de Ca^{2+} por 1 ATP. Su actividad libera a la troponina del Ca^{2+} disminuyéndose así la afinidad de la actina por la miosina. En resumen, la relajación del músculo y no la contracción es el fenómeno que requiere de un gasto importante de energía mediada por la hidrólisis de ATP.

En el músculo el acople e-c y la relajación suceden sin mayor problema cuando la frecuencia de estimulación y el tiempo de estimulación están en un rango. Sin embargo, durante una estimulación

prolongada, el músculo es refractario a la estimulación y disminuye su fuerza de contracción, lo que dará origen a la fatiga.

1.3 Tipos de fibras

Pese a que las fibras musculares comparten esta estructura y mecanismo de contracción, existen diferencias notables entre ellas, basadas principalmente en su velocidad de contracción, metabolismo y apariencia. Actualmente hay una clasificación amplia de los tipos de fibras del músculo esquelético, donde en humano se han descrito hasta siete subtipos⁶. Sin embargo, se usará una clasificación más sencilla basada principalmente en su metabolismo y localización (postural o de movimiento): Fibras Lentas (FL)/ tipo I y Fibras Rápidas (FR) / tipo II. Las FL, también conocidas como fibras aeróbicas u oxidantes (músculo rojo) son abundantes en mioglobina, por lo que almacenan oxígeno, tienen una mayor cantidad de enzimas oxidantes, densidad mitocondrial y mayor densidad capilar por músculo¹. En el caso de las FR, también conocidas como fibras anaeróbicas o glucolíticas, presentan una mayor cantidad de enzimas glucolíticas, fosfocreatina y ATPasa de actomiosina¹. Las FR tienen una mayor velocidad de contracción además de una mayor generación de fuerza, mientras que las FL se contraen y relajan en mayor tiempo y con una generación de fuerza menor. Las fibras rápidas liberan más fácilmente el lactato al torrente circulatorio para ser llevado al hígado donde, a partir del lactato, se realiza la síntesis de glucosa (gluconeogénesis) en el conocido Ciclo de Cori.

En términos de sus proteínas reguladoras, las FR y las FL difieren entre sí, ya que cada una tiene una isoforma específica de la Cadena Pesada de Miosina⁷, del RyR y de la SERCA. Las isoformas SERCA1 y SERCA2 han sido caracterizadas como tejido específicas en FR y FL respectivamente, aunque existen más isoformas en otros tejidos⁸. Es importante destacar que las FR son más proclives a la fatiga que las FL.

1.4 Hipótesis sobre la fatiga

La fatiga muscular es un fenómeno reversible que consiste en un decremento transitorio en la producción máxima de fuerza durante la actividad contráctil aun cuando la duración y la intensidad del estímulo permanezcan inalteradas. En músculo aislado, la fatiga se presenta aun cuando existe un suplemento adecuado de glucosa, ATP y amortiguación del pH. La definición ha sido establecida desde hace tiempo, sin embargo el mecanismo molecular que explique este fenómeno todavía es elusivo. Se han propuesto varias hipótesis que están en controversia al no haber suficiente evidencia experimental para excluirse entre ellas.

1.4.1 Fatiga por acumulación de lactato

Una de las primeras hipótesis que surgieron para explicar este fenómeno fue que la acumulación de lactato tenía un efecto detrimental en la producción de fuerza del músculo tanto en fibras rápidas como en fibras lentas⁹. Esto con base a múltiples correlaciones en los niveles de lactato y la caída de la fuerza muscular⁹, principalmente en las FR debido a su metabolismo anaeróbico. Años después en estudios *in vivo*¹⁰ e *in vitro*¹¹ en los que se adicionó lactato a los músculos, se observó una leve caída en la fuerza muscular pero no en los niveles previamente reportados. Posteriormente, se demostró que al adicionar 30mM de lactato en fibras aisladas, no se afecta el aparato contráctil ni el acople e-c de estas fibras¹².

De manera similar a la hipótesis del lactato, existen datos de que en personas fatigadas por ejercicio exhaustivo se presenta una disminución del pH muscular hasta a 6.6 (pH en reposo: 7.05)¹³ por lo que hubo una asociación inmediata. Sin embargo, en estudios con músculos aislados, se observó una disminución no mayor a pH 6.9¹⁴, poniéndose en duda la necesidad de un cambio importante de pH para producir fatiga ya que ésta sucede aunque el medio experimental esté amortiguado.

1.4.2 Fatiga por acumulación de P_i

Varias de las hipótesis de la fatiga postulan que subproductos del metabolismo muscular son los causantes de ésta, en particular la acumulación de fosfato inorgánico (P_i). En el músculo aislado de ratón, se observa que el incremento en la concentración de P_i disminuía la fuerza muscular en un 20% tras una serie de 10 tétanos¹⁵. En experimentos similares, donde se mantuvo un pH bajo y una temperatura más elevada (30°C), la adición de 30mM de P_i causó un descenso significativo en la fuerza generada además de una activación disminuida de las fibras musculares¹⁶. Sin embargo, esta hipótesis ha sido poco favorecida ya que la concentración de P_i usado en los experimentos se aleja de condiciones fisiológicas además de que los P_i son parte del sistema amortiguador del pH celular.

Dentro de las múltiples hipótesis para explicar la fatiga, la amortiguación del potencial redox durante la actividad muscular juega un papel clave en la participación de la óxido-reducción de proteínas para la regulación de su actividad mecánica.

1.4.3 Estado de óxido-reducción en el músculo

El ambiente redox es una forma abreviada de describir el potencial reductor de la célula con base en la relación que existe entre una pareja de moléculas que oscilan entre un estado de liberación y aceptación de electrones (pareja redox) respectivamente. La relación entre la concentración de esta pareja determina el potencial redox y por consiguiente, es un fenómeno que provee de energía a diversos procesos celulares.

Uno de los amortiguadores redox celulares es el glutatión, un tripéptido (glutamato-cisteína-glicina) que se encuentra en concentraciones elevadas en todas las células. Éste se utiliza como pareja redox para estimar el ambiente reductor celular con base en el cociente de la concentración entre glutatión

reducido (GSH) y disulfuro de glutatión (GSSG) ¹⁷. El potencial redox de una célula en reposo es de -300mV, que corresponde al potencial de la pareja GSSG/2GSH en una célula en reposo, lo que le confiere un ambiente reductor neto¹⁸.

Se ha observado que la actividad muscular aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés)¹⁹ además de óxido nítrico (NO), que a su vez puede convertirse en peroxinitrito, un tipo de Especie Reactiva de Nitrógeno (RNS)²⁰. Estas ROS y RNS alteran el estado redox de las proteínas musculares, en particular se ha demostrado que inactivan a SERCA debido a la oxidación reversible de cisteínas presentes en esta proteína²¹. Sin embargo, también la oxidación de cisteínas del RyR favorecen la apertura del canal de calcio y en consecuencia un aumento en la contracción y desarrollo de fuerza.

En particular, cisteínas que se encuentran en una configuración adyacente, del tipo (Cys-X_{n=2-6}-Cys), denominados como Grupos Tioles Vecinales (VTG por sus siglas en inglés)⁵ son susceptibles a modificaciones debido a cambios en el ambiente redox celular. Está demostrado que estos VTGs tienen un efecto regulador en la función de SERCA y RyR^{22,23}, donde la oxidación específica de estas cisteínas con óxido de fenilarsina (PAO por sus siglas en inglés) causa cambios conformacionales que afectan a la fuerza de contracción del músculo y potencia la fatiga²². Interesantemente, estos VTGs no se presentan en proteínas estructurales como la actina, miosina y titina.

Las oxidaciones específicas de proteínas con VTGs se postulan como oxidaciones reversibles que precisamente protegen a las proteínas reguladoras de oxidaciones irreversibles²³. Más importante aún, estas modificaciones a VTGs se propone que son un mecanismo mayúsculo de activación de vías de señalización celulares²⁴.

1.5 Antioxidantes

Existen numerosos estudios que apoyan la hipótesis del potencial redox en la fatiga, por lo que se busca encontrar las moléculas fisiológicas que reviertan este estado de oxidación en la fibra y aquéllas que restauren su potencial de contracción después de la fatiga.

Se proponen dos moléculas fisiológicas que podrían llevar a cabo esta última función. La primera es GSH, cuya concentración es de 1-11 mM (1mM en músculo esquelético) y es considerado el mayor antioxidante activo^{25,26} de la célula. Esta molécula en su estado reducido es un monotiol (Figura 5) pero también se encuentra dentro de la célula unida a otra molécula de glutatión como un disulfuro de glutatión (GSSG).

El GSH tiene la capacidad de interactuar y reducir cistinas²⁷ así como formar conjugados con compuestos electrofílicos sin necesidad de una enzima o a través de la acción de la glutatión transferasa²⁸.

El segundo es el ácido lipoico (α -LA) que en su estado reducido se denomina ácido dihidrolipoico (Figura 5). El α -LA es un antioxidante que neutraliza radicales libres de manera eficiente²⁹, en ocasiones mejor que el GSH mismo³⁰, principalmente por su potencial reductor de -320 mV. También se ha reportado que el α -LA aumenta las reservas de GSH de una manera dosis dependiente, mejorando el potencial antioxidante de las células³¹. El α -LA es una molécula sintetizada por el organismo a partir de ácido octanoico y en las células es usado principalmente como cofactor de la piruvato deshidrogenasa y de la α -cetoglutarato deshidrogenasa³¹.

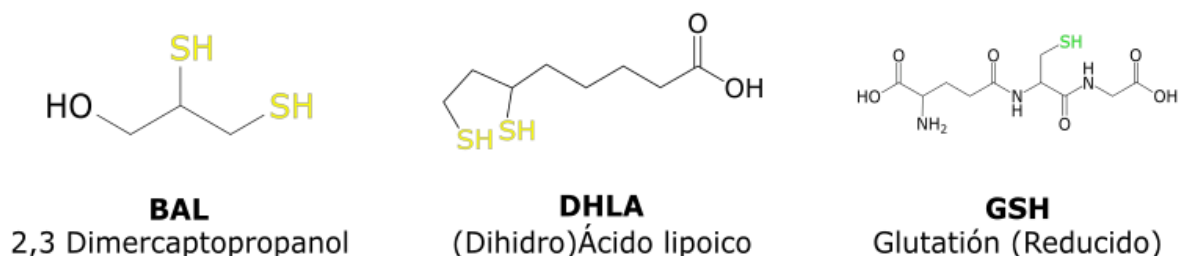


Fig 5. Estructura de los distintos tioles. Se resalta en amarillo los tioles vecinales (ditioles) y en verde al monotiol del Glutathión.

El GSH se encuentra predominantemente en el citosol mientras que el α -AL se localiza principalmente en las mitocondrias³², sin embargo, el α -AL es anfipático y tiene la capacidad de cruzar membranas con facilidad³³. El α -AL tiene la capacidad de interactuar directamente con ROS y otros radicales libres³⁴ mientras que el GSH está más relacionado con enzimas como las tiorredoxinas y las glutarredoxinas³⁵. Estas últimas catalizan una serie de reacciones para reducir VTGs utilizando GSH y NADPH³⁵. Por otro lado, la Tiorredoxina (Trx) es una proteína globular pequeña (12-kDa) que presenta dos cisteínas en su sitio activo³⁶. Este ditiol ayuda a mantener el ambiente celular en un estado reducido y tiene un papel en la regulación de la actividad de ciertas proteínas al modificar el estado redox de éstas³⁷. La Trx es a su vez reducida por la Tiorredoxina Reductasa (TrxR), una óxido-reductasa homodimérica. A través del sitio activo de la TrxR, la Trx y otras proteínas convierten su enlace disulfuro en un ditiol al utilizar al NADPH como un donador de electrones³⁶.

2. Objetivo

Evaluar el efecto del α -AL en la reversión de la fatiga inducida por estimulación eléctrica y potenciada por la administración de PAO en músculo esquelético aislado de fibras lentas y rápidas.

Por otro lado, también buscamos evaluar el efecto que pudiera tener el glutatión en este fenómeno. Aunque estructuralmente no presenta un ditiol sino un monotiol, buscamos determinar si la gran cantidad de GSH en la célula y su importancia como amortiguador redox pudieran tener un papel en la reversión de la fatiga.

3. Hipótesis

Nosotros postulamos que, al incubar a músculos, tanto de fibras rápidas como de lentas, con ácido dihidrolipoico, éste pueda acelerar la recuperación tras un protocolo de estimulación eléctrica con o sin la presencia del agente oxidante PAO. A su vez, creemos que la adición de glutatión reducido al músculo no ayudará a la recuperación de éste tras exponerlo al mismo protocolo de estimulación.

4. Materiales y Métodos

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con el Manual Operativo del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina (CICUAL) y aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 270–300 g. Fueron sacrificadas por dislocación cervical y los músculos *Extensor Digitorum Longus* (EDL) y sóleo fueron aislados rápidamente a temperatura ambiente y puestos en solución de Krebs fría con oxigenación continua. Elegimos estos músculos ya que se componen predominantemente por fibras rápidas y lentas respectivamente.

4.2 Materiales

Óxido de fenil arsénico (PAO), 2,3-dimercaptopropanol (British anti-lewisite; BAL), glutatión reducido (GSH) y ácido lipoico reducido (DHLA) fueron comprados en Sigma-Aldrich Co.

4.3 Preparación de músculo

El músculo aislado fue sujetado en una cámara de acrílico equipada con electrodos de platino a lo largo de las paredes para que los electrodos estuvieran en contacto con toda la longitud del músculo (Figura 6). La cámara se llenó con Solución de Krebs que contiene en (mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 11 glucosa, 1 Na₂HPO₄ y 15 NaHCO₃ burbujeada con 95% O₂ y 5% CO₂ para alcanzar un pH de 7.0. Los músculos fueron atados con hilo de seda de manera distal a un fórceps y de manera proximal a un transductor de fuerza. Los electrodos de platino fueron conectados en

paralelo a un estimulador Grass S88. Todas las estimuciones se realizaron a 90 Volts, 70 Hertz y una duración variable según se indica en el pie de figura correspondiente.

4.4 Protocolo de estimulación

Se dieron pulsos eléctricos sencillos de 0.6 ms para encontrar el voltaje de tensión máxima. Posteriormente se realizaron exclusivamente estimuciones tetánicas; éstas son la suma de múltiples pulsos eléctricos sencillos en un breve periodo de tiempo que causan una contracción muscular con mayor fuerza y duración. Para obtener la longitud óptima del sarcómero (2.4 μm), los músculos fueron estirados hasta encontrar su fuerza de contracción máxima. Una vez determinado la longitud óptima se dio inicio al protocolo de estimulación. El protocolo consta de tres partes, que están representados en la Figura 7. Todos los músculos pasaron por los 3 protocolos de estimulación, de manera continua incluyendo los intervalos marcados como descansos.

Figura 7, Protocolo I. Después de determinar la longitud óptima, se realizaron dos tétanos de 1 segundo de duración denominados T1 y T2 con dos minutos de reposo entre ellos a manera de calibración. Después de dos minutos de reposo se realizó un tétano de 3 segundos, T3. Inmediatamente después se adicionó 1 mM de óxido de fenil arsénico (PAO) y se mantuvo el músculo EDL en incubación durante 3 minutos y el sóleo durante 5 minutos. Posteriormente se retiró el medio y se lavó con solución Krebs el músculo 3 veces para remover el PAO aún presente en la solución. Después de la eliminación del PAO, se realizaron dos tétanos de 1 segundo, que corresponden a T4 y T5 con 2 minutos de reposo entre tétanos para evaluar el efecto de PAO. Tras el segundo tétanos se adicionó al medio 1 mM de 2,3-dimercaptopropanol (British anti-lewisite; BAL), 10mM de glutatión reducido (GSH) o 5 mM de ácido lipoico reducido (DHLA) según el caso. Los músculos EDL y sóleo respectivamente fueron incubados durante 5 minutos en presencia de BAL o GSH, mientras que en

el caso del DHLA la incubación duró 12 minutos. Antes de su uso el DHLA fue disuelto en solución de Krebs y sonicado durante 10-15 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se retiró el medio y se lavó el músculo para remover el exceso de las sustancias utilizadas durante la incubación para dejar al músculo respectivamente en solución de Krebs.

Figura 7 Protocolo II. En el músculo pre incubado, se realizaron cinco tétanos de 3 segundos a los que se les denominó de T6 a T10 cada uno con 2 minutos de reposo entre ellos. Una vez terminado el quinto tétanos, se dieron 10 minutos de reposo. Posteriormente se realizaron 3 tétanos de recuperación de T11 a T13 de 1 segundo de duración con 10 minutos de reposo entre ellos. Después del último tétanos se dieron 2 minutos de reposo para iniciar con la parte final del protocolo.

Figura 7, Protocolo III. Consta de un tren de estimulación de tétanos de 1 segundo hasta llegar al 50% de la fuerza inicial que corresponde a T14. Subsecuente al tren se dieron 10 minutos de reposo y se realizaron 3 tétanos de 1 segundo separados por 10 minutos de reposo entre ellos para determinar la recuperación de la fatiga, los tétanos corresponden a T16 al T18.

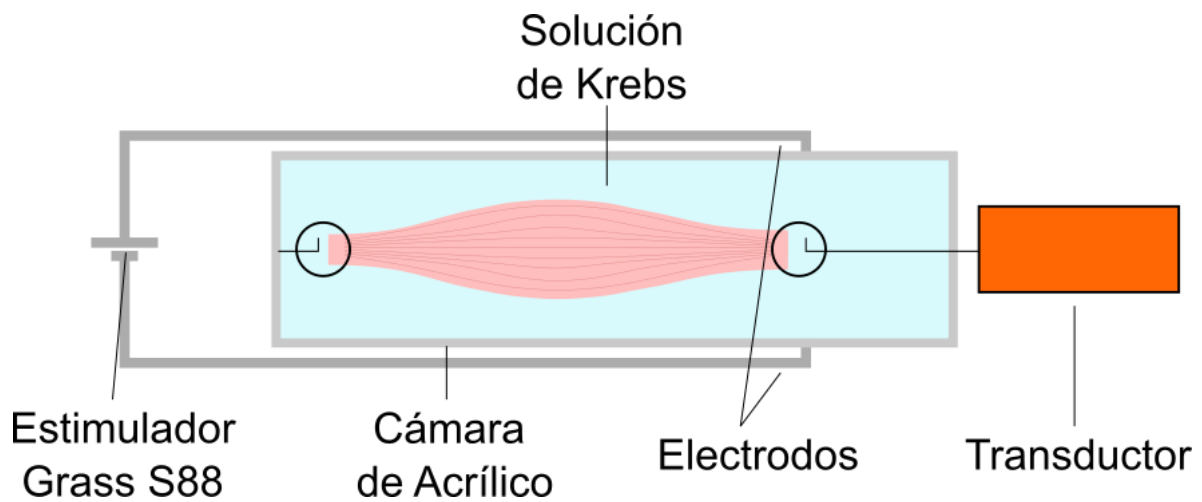


Fig 6. Esquema del arreglo experimental.

4.5 Análisis estadístico

Se determinaron el promedio y el error estándar para cada uno de los grupos. Los valores que presentamos corresponden a las mediciones anteriores normalizadas al primer tétanos o al tétanos de mayor fuerza de cada porción del protocolo. Se realizaron pruebas t de Student utilizando una alfa de 0.05 y ANOVA de 1 vía para comparar los distintos grupos. Utilizamos OriginPro versión 8.1 para graficar y analizar todos los resultados.

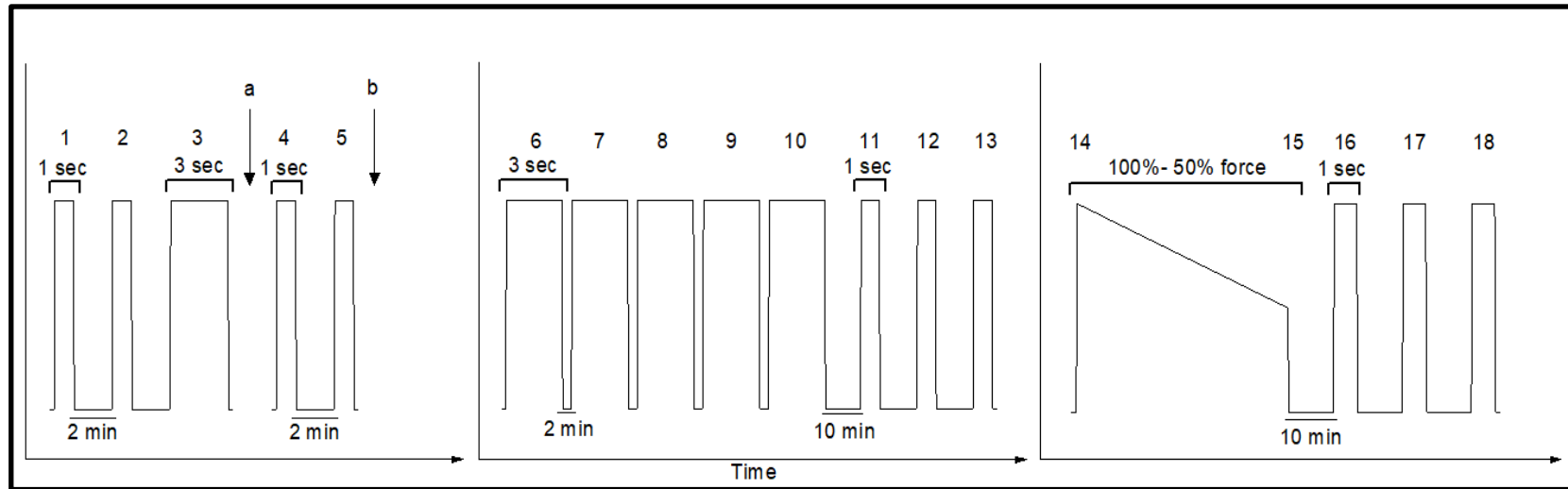


Fig 7. **Representación esquemática del protocolo de estimulación.** I) Protocolo I. Dos téτανos de 1 seg como calibración, seguidas de un téτανos de 3 seg para desarrollar la fuerza máxima. Posteriormente una incubación con PAO (a) y dos téτανos de 1 seg para evaluar su efecto. Por último, una incubación con GLU, BAL o α -AL respectivamente (b) . II) Protocolo II. Cinco téτανos de 3 seg seguido de tres téτανos de recuperación de 1 seg con descanso de 10 min entre cada uno. III) Protocolo III. Tren de téτανos de 1 seg hasta llegar al 50% de la fuerza inicial; a continuación, tres téτανos de recuperación de 1 seg con descanso de 10 min entre cada uno. En la parte superior se indica el número correspondiente a cada téétano del protocolo.

5. Resultados

5.1 Contracción del músculo esquelético en presencia de óxido de fenilarsina (PAO)

En la Figura 8 podemos observar la caída en la producción de fuerza debido a la incubación con PAO. En las Figuras 8B y 8E mostramos los valores de los 3 tétanos control (T1-T3) y de los dos tétanos tras la incubación con PAO (T4-T5). Estos datos fueron normalizados al valor máximo de fuerza generado en las estimulaciones control y podemos observar una diferencia significativa en la producción de fuerza entre el músculo control y el músculo incubado en PAO 1mM (Fig 8B y 8E). Si comparamos la diferencia entre T5 y T3 (Fig 8C) encontramos que esta caída en la fuerza en EDL control es de 67.1 ± 29.3 mN ($4.2 \pm 1.7\%$) contra $28.3 \pm 1.7\%$ en EDL incubado en PAO. De manera similar, en sóleo control la diferencia es de 141.4 ± 73.8 mN ($8.6 \pm 4.2\%$) en comparación con $27.7 \pm 2.6\%$ en sóleo incubado con PAO. A la vez, si comparamos T5 contra T2 (Fig 8F) observamos que el músculo EDL control cae 35.4 ± 45.1 mN ($2.37 \pm 2.6\%$) y al ser incubado con PAO cae $29.9 \pm 1.6\%$. En el caso del músculo sóleo la diferencia se acentúa, ya que mientras el músculo incubado en PAO cae $10.1 \pm 5.4\%$, el sóleo control mejora en 64.6 ± 52.8 mN ($9.1 \pm 8.2\%$) su producción de fuerza. Todos los datos presentados son error estándar del promedio y cada grupo tiene una $n = 8$.

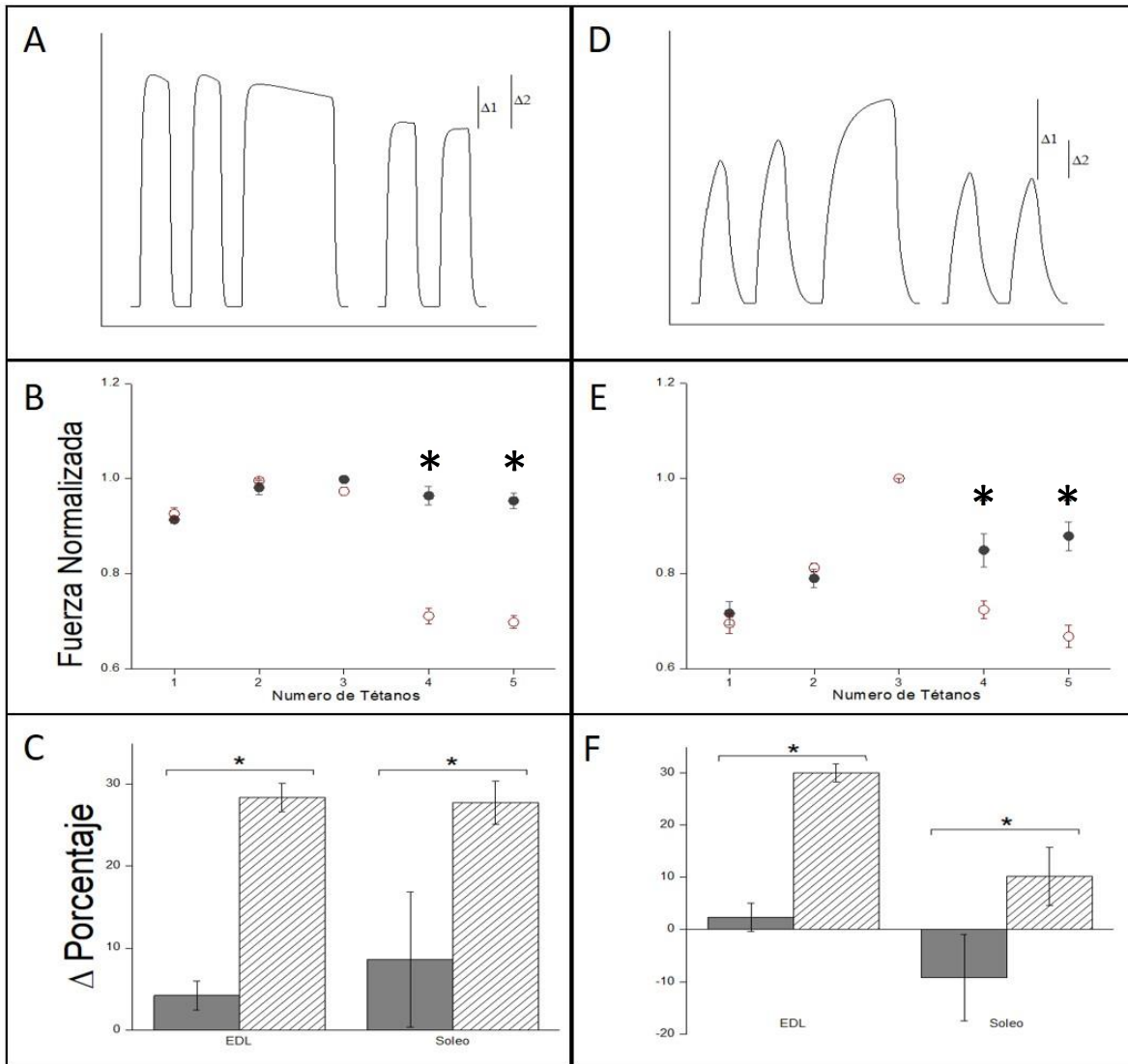


Fig 8. **Contracción del músculo esquelético en presencia de óxido de fenilarsina (PAO) (Protocolo I).** A) Esquema representativo del efecto de PAO sobre el EDL. B) Análisis estadístico del experimento en función del número de estimulación tetánica en músculo control (●) y en músculo previamente incubado en 1 mM PAO (○) n=7.

C) Diferencia de fuerza ($\Delta 1$) de T3-T5 en A y D para EDL y sóleo control (■) y previamente incubado en PAO (▨).

D) Esquema representativo del efecto de PAO sobre el músculo sóleo. E) Análisis estadístico del experimento en función del número de estimulación tetánica en músculo control (●) y en músculo previamente incubado en 1 mM PAO (○) n=8. F) Diferencia de fuerza ($\Delta 2$) de T2-T5 en A y D para EDL y sóleo control (■) y previamente incubado en PAO (▨).

(*) Representa diferencias significativas respecto al control.

5.2 Pérdida de la fuerza de contracción por PAO, BAL, GSH y α -AL

Evaluamos la diferencia en la caída en la producción de fuerza en una serie de 5 tétanos (T6-T10) en las distintas condiciones experimentales (Figura 9). La diferencia en músculo EDL entre T6 y T10 fue de 274.4 ± 37.6 mN ($19.0 \pm 2.5\%$) Control; 30.1 ± 2.1 en músculo incubado solamente con PAO (IP); 29.6 ± 2.0 en músculo incubado en PAO y GSH (IPG); $27.4 \pm 2.0\%$ en músculo incubado en PAO y BAL (IPB); $28.9 \pm 2.7\%$ en músculo incubado en PAO y α -AL (IPL); y $30.7 \pm 1.1\%$ en músculo incubado solamente en α -AL (IL)(Fig 9B).

En el caso del músculo sóleo, la pendiente fue de 7.4 ± 16.9 mN ($0.68 \pm 1.7\%$) para el control; $18.0 \pm 3.3\%$ para IP; $17.9 \pm 2.7\%$ para IPG; $13.5 \pm 4.0\%$ para IPB; $11.0 \pm 3.7\%$ para IPL; y $6.0 \pm 2.8\%$ para IL (Fig 9D). En músculo EDL, solamente el músculo IL presenta diferencias respecto al control, mientras que en sóleo, IPG e IPB presentan esta misma diferencia. Esto nos muestra que, en estos 3 grupos, el músculo se fatigó en mayor medida, mientras que el resto de los grupos se fatigaron de manera similar a su control respectivo. Todos los datos presentados son los promedios y error estándar de cada grupo, $n = 4$.

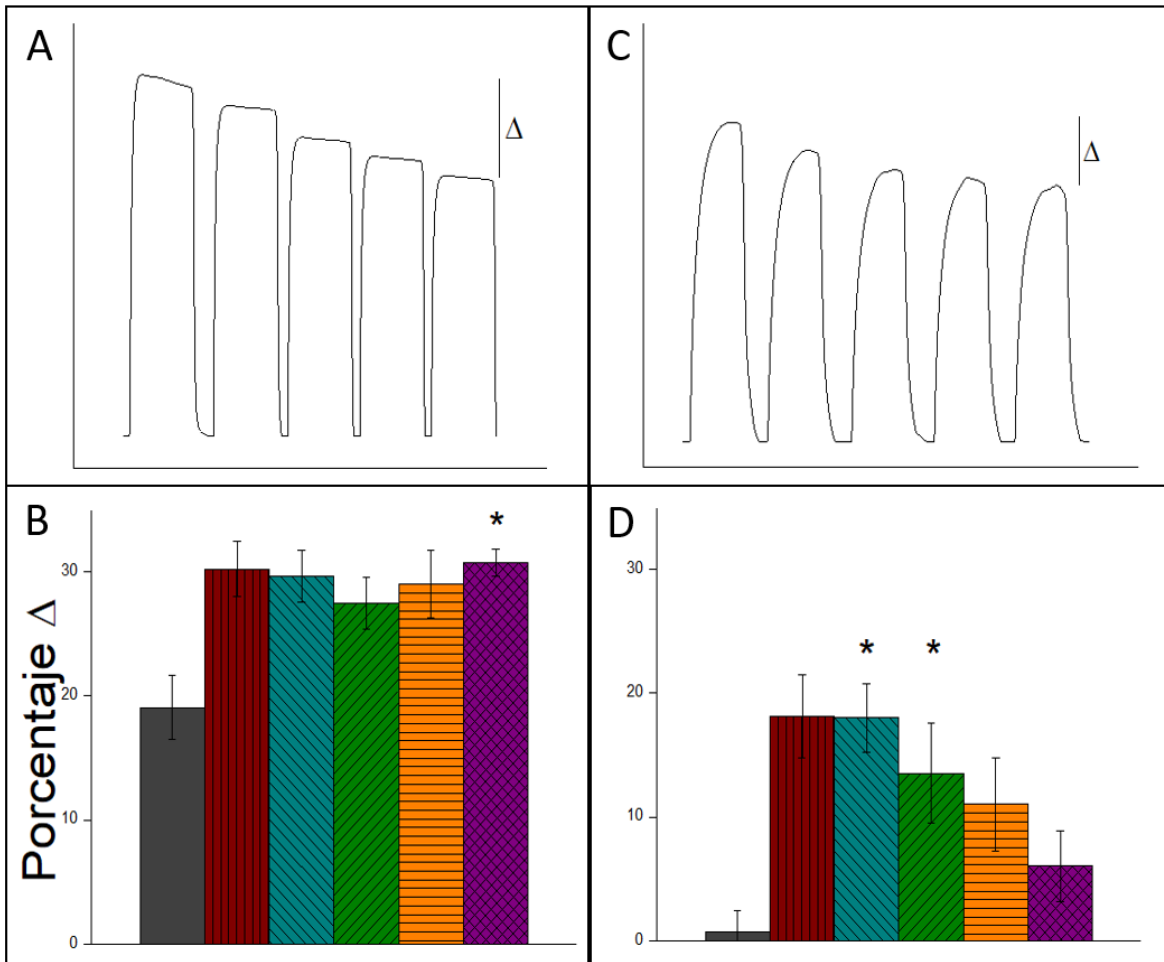


Fig 9. **Pérdida de la fuerza de contracción. (Protocolo II).** A) Esquema representativo del efecto de PAO, BAL, GLU y α -AL sobre EDL, donde Δ representa la diferencia en fuerza de T6-T10. B) Análisis estadístico del experimento en función del número de estimulación tetánica para los grupos experimentales control (■), IP (■), IPG(■), IPB (■), IPL(■) e IL (■) n=4. C) Esquema representativo del efecto de PAO, BAL, GLU y α -AL sobre sóleo donde Δ representa la diferencia en fuerza de T6-T10. D) Análisis estadístico del experimento en función del número de estimulación tetánica para los grupos experimentales control(■), IP (■), IPG(■), IPB (■), IPL(■) e IL (■) n=4. (*) Representa diferencias significativas respecto al control.

5.3 Recuperación de la fuerza de contracción por PAO, BAL, GSH y α -AL

Tras los 5 tétanos anteriores, realizamos 3 tétanos de recuperación con descansos prolongados (Fig 10A y 10D). Los valores del inicio y final de esta serie de tétanos (T6 y T10) junto con sus respectivas recuperaciones (T11-T13) fueron normalizados al primer tétanos de la serie (T6) (Figuras 10B y 10E). Al comparar sus recuperaciones con T10, observamos que el único grupo con una recuperación significativa fue IPL en el músculo EDL (42.4 ± 38.9 mN ($2.94 \pm 2.7\%$) de recuperación del control vs $10.34 \pm 1.7\%$ de IPL). Sin embargo, al comparar las recuperaciones del control, IPB e IPL (Fig 10C), no encontramos diferencias.

Por el contrario, en las recuperaciones del sóleo, ningún grupo mejoró significativamente respecto a T10, la magnitud total de la recuperación de IPL es mayor que la del control ($5.72 \pm .7\%$ del control vs $10.93 \pm 2.5\%$ de IPL) (Fig 10F). Todos los datos presentados son los promedios y error estándar de cada grupo, $n = 4$.

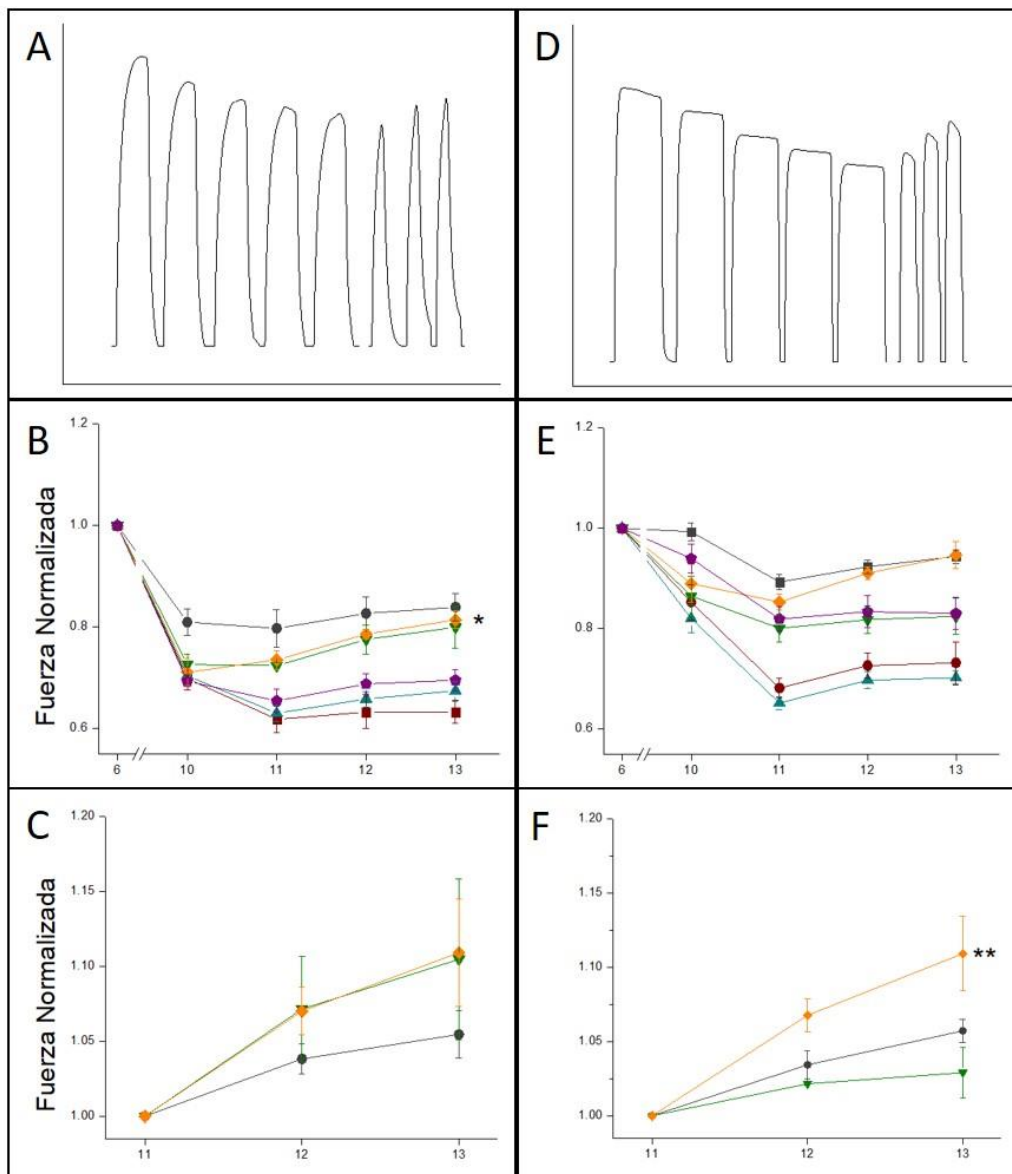


Fig. 10 **Recuperación de la fuerza de contracción. Protocolo II.** A) Esquema representativo del efecto de PAO, BAL, GLU y α -AL sobre la recuperación de fuerza del EDL de T11 a T13. B) Análisis estadístico del experimento en función del número de estimulación tetánica para los grupos experimentales control (■), IP (●), IPG (▲), IPB (▼), IPL (◆) e IL (◆) n=4. C) Pendiente de recuperación del EDL control (■), IPB (▼) e IPL (◆). D) Esquema representativo del efecto de PAO, BAL, GLU y α -AL sobre la recuperación de fuerza del sóleo de T11 a T13. E) Análisis estadístico del experimento en función del número de estimulación tetánica para los grupos experimentales control (■), IP (●), IPG (▲), IPB (▼), IPL (◆) e IL (◆) n=4. F) Pendiente de recuperación del sóleo control (■), IPB (▼) e IPL (◆). (*) Representa diferencias significativas respecto a T10. (**) Representa diferencias significativas respecto a T11.

5.4 Recuperación de la fuerza de contracción posterior al tren de estimulación

En la Figura 11 podemos observar la fuerza faltante para llegar al 100% de la fuerza producida al inicio de un tren de tétanos de 1 segundo tras el tercer tétanos de recuperación (Figura 11B y 11E). En el músculo EDL (Figura 11B), apreciamos que sólo IPL se recuperó mejor que el control (935.6 ± 21.1 mN ($78.61 \pm 2.6\%$) vs $106.13 \pm 6.0\%$) además de que excedió la cantidad de fuerza inicial del tren ($+6.13\%$). En músculo Sóleo (Figura 11E), a los grupos IPB, IPL e IL sólo les faltaron $12.13 \pm 4.3\%$, $3.35 \pm 2.4\%$ y $9.19 \pm 1.6\%$ respectivamente para llegar a la fuerza inicial del tren en comparación con los 196.3 ± 23.4 mN ($21.25 \pm 2.0\%$) que le faltaron al control. También evaluamos la velocidad de recuperación de los grupos, al determinar cuánto se recupera cada uno tras el primer periodo al terminar el tren. En músculo EDL (Fig. 11C), los grupos IPB ($60.9 \pm 3.9\%$) e IPL ($65.6 \pm 22.4\%$) tuvieron una mejor recuperación que el control ($38.2 \pm 2.9\%$). En sóleo (Figura 11F), los grupos IPB ($78.8 \pm 7.3\%$), IPL ($94.9 \pm 4.4\%$) e IL ($80.5 \pm 2.2\%$) aumentaron su fuerza tras el descanso mejor que el control ($60.2 \pm 4.2\%$). Todos los datos presentados son los promedios y error estándar de cada grupo, $n = 4$.

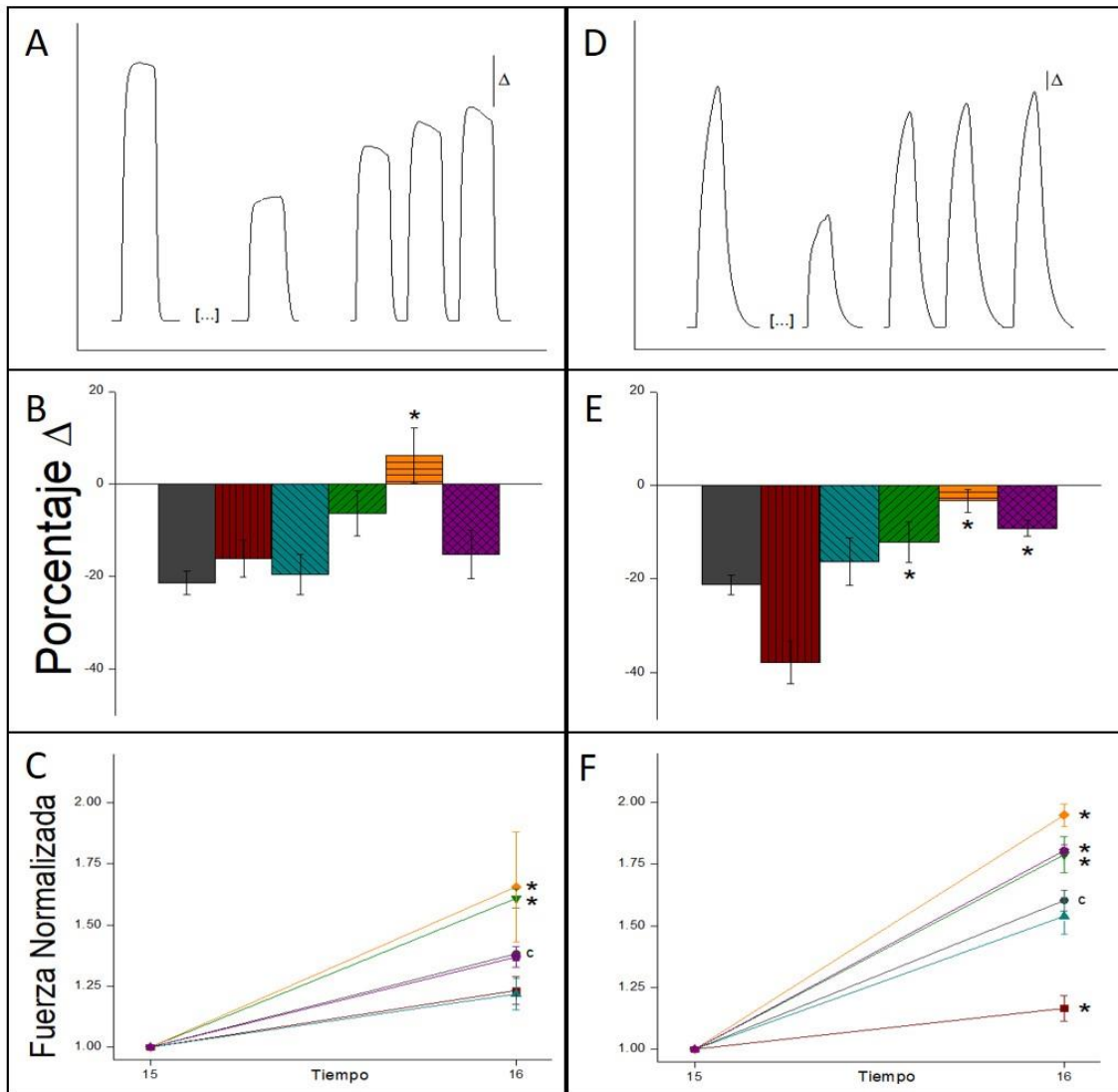


Fig. 11 Recuperación de la fuerza de contracción posterior a tren de estimulación (Protocolo III). A) Esquema representativo de un tren al 50% de la fuerza de contracción en EDL de T14 a T15 y su recuperación de T16 a T18, donde Δ corresponde a la fuerza faltante para la recuperación al 100% (T14). B) Análisis estadístico del experimento en función del número de estimulación tetánica para los grupos experimentales control (c) (■), IP (■), IPG(▤), IPB (■), IPL(▨) e IL (■) n=4. C) Velocidad de recuperación de la fuerza después del tren de estimulación tetánica en EDL.

D) Esquema representativo de un tren al 50% de la fuerza de contracción en sóleo de T14 a T15 y su recuperación de T16 a T18, donde Δ corresponde a la fuerza faltante para la recuperación al 100% (T14). E) Análisis estadístico del experimento en función del número de estimulación tetánica para los grupos experimentales control (c) (■), IP (■), IPG(▤), IPB (■), IPL(▨) e IL (■) n=4. F) Velocidad de recuperación de la fuerza después del tren de estimulación tetánica en EDL. (*) Representa diferencias significativas respecto al control.

5.5 Efecto de PAO, BAL, GSH y α -AL sobre la fatiga

Durante el tren de tétanos anterior, se midió el tiempo que tardó cada músculo en llegar al 50% de su fuerza inicial siguiendo el Protocolo III (Figura 7). En el músculo sóleo, el grupo control tardó en fatigarse 154 ± 9.4 seg, tiempo significativamente mayor que en los grupos IP (108.6 ± 15.3 seg), IPG (110.1 ± 11.5 seg), IPB (110.2 ± 11.8 seg) e IPL (73 ± 9.4 seg) (Figura 12). En el EDL ningún grupo presentó diferencias respecto a la recuperación del control, con un tiempo de fatiga al 50% de 68.1 ± 2.8 seg. Todos los datos presentados son los promedios y error estándar de cada grupo, $n = 4$.

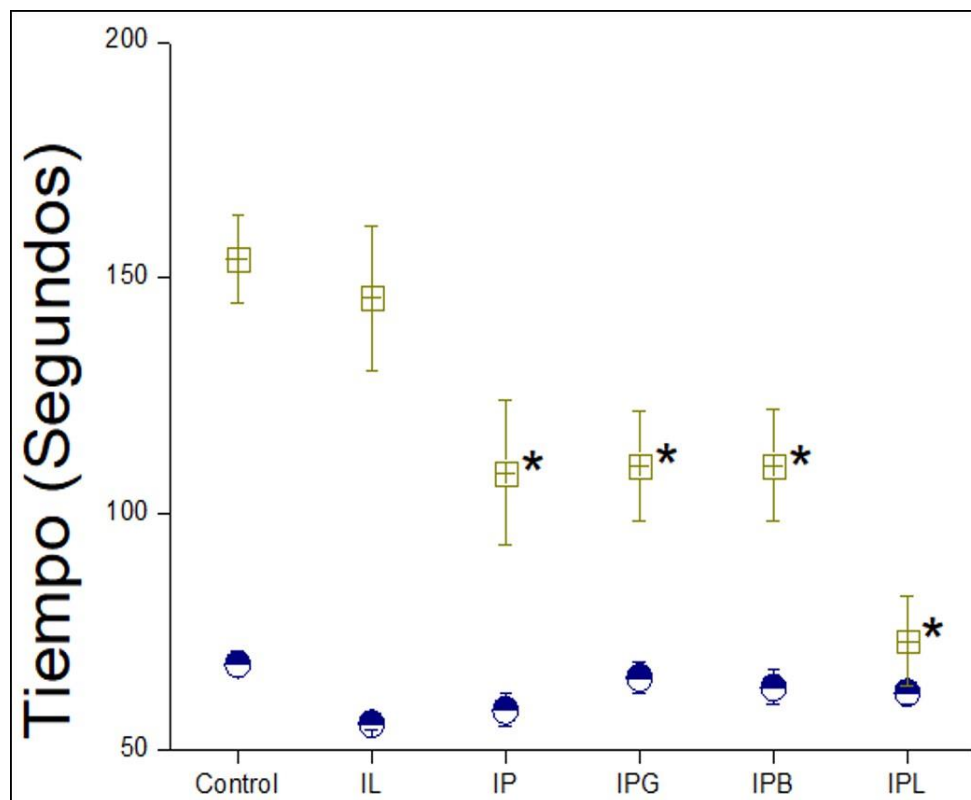


Fig 12. Efecto de PAO, BAL, GSH y α -AL sobre la fatiga (Protocolo III).

Tiempo en (s) de aparición de la fatiga al 50 % de la fuerza de contracción en distintas condiciones de incubación. Músculo EDL (●) y sóleo (◻).

(*) Representa diferencias significativas respecto al control.

6. Discusión

A partir de nuestros datos, determinamos lo siguiente: 1) El PAO disminuye la fuerza de contracción y acelera la aparición de fatiga. 2) BAL logra disminuir el tiempo de recuperación de la fatiga en músculo incubado previamente con PAO. 3) El glutatión no tiene efecto sobre la recuperación de la fatiga en ausencia o en presencia de PAO. 4) El α -AL disminuye el tiempo de recuperación de la fatiga principalmente cuando ésta es causada por la incubación con PAO. 5) La presencia de concentraciones supra fisiológicas de α -AL acentúa la fatiga en el músculo rápido.

6.1 Efecto del PAO sobre la fuerza de contracción

El óxido de fenilarsina (PAO), es un compuesto que ha sido estudiado por más de 100 años debido a sus diversos efectos biológicos. Este compuesto, que contiene un arsénico trivalente, forma conexiones heterocíclicas con tioles vecinales de proteínas (ditioarsinas), lo que lo convierte en un oxidante específico de estos VTGs³⁸. En músculo esquelético, nuestro grupo ha demostrado que cuando se adiciona PAO a EDL, éste presenta oxidación de VTGs en proteínas reguladoras de calcio como SERCA y RyR lo cual se ve reflejado en una aparición temprana de fatiga muscular²³. De hecho, al estimular en un tren de sacudidas simples, aquellos EDLs incubados en presencia de PAO pierden el 23.5% de su fuerza al final del protocolo de estimulación en comparación con el control²³. En nuestros experimentos tenemos una caída similar, ya que tras la incubación con PAO y dos estimulaciones tetánicas, la fuerza cae 23% en comparación con EDLs control. En el caso del músculo sóleo la caída de la fuerza después de la incubación con PAO es del 18.7%, lo que significa que es más resistente al efecto del arsenical

Este resultado se podría dar en principio por las diferencias estructurales de las isoformas de SERCA que presentan las fibras rápidas y en las fibras lentas. En el caso de las FR, SERCA 1a es la isoforma característica de este tipo de fibra y se encuentra de manera abundante, aunque también hay pequeñas cantidades de SERCA 2b. Mientras que en las FL, SERCA 2a es la forma predominante donde también SERCA2b está expresada. Sin embargo, es notable que estas isoformas mantienen una estructura primaria altamente conservada (84%) y que esencialmente conservan la misma identidad topográfica dentro del RS, así como su estructura terciaria³⁹. Pese a esta estructura similar, si comparamos la secuencia de SERCA 1a y 2a en función de sus tioles encontramos que SERCA1a contiene 24 cisteínas, mientras que SERCA2a contiene 26, más importante aún, la SERCA1a tiene 5 VTGs en comparación con sólo 3 VTGs de SERCA2a (Figura 13) ^{22,40}. Esto podría explicar la diferencia en el efecto de PAO en FL y FR, ya que SERCA1a sería más susceptible a oxidaciones de sus VTGs y por ende disminuiría su actividad.

12	364	525	675
70	377	561	774
268	417	614	876
318	420	636	888
344	471	670	910
349	498	674	938

70	404	560	841
268	417	595	875
318	420	613	887
344	447	635	909
349	471	669	937
364	498	674	
377	524	772	

Fig 13. Las tablas siguientes muestran el número de posición de todos los residuos de cisteína en la secuencia de SERCA1a (A) y SERCA2a (B). Las celdas resaltadas muestran los tioles vecinales. Modificado de Álvarez, 2009

Esta diferencia en composición podría ser en parte la responsable de la disparidad en el efecto de PAO en los distintos tipos de fibra, pero existen otros factores que no se pueden descartar, como que PAO afecte a otras proteínas del músculo. Por ejemplo, se ha reportado que este arsenical puede

inhibir a la piruvato deshidrogenasa a través de una inhibición alostérica al unirse a su coenzima, el α -AL; limitando la producción de ATP⁴¹. A su vez se ha encontrado que los arsenicales pueden regular positivamente a p22phox, una subunidad de la oxidasa de NADPH (NADPHO); activan la translocación de Rac1, un activador de NADPHO; y activan a CDC42, un regulador positivo de NADPHO. Todo lo anterior se refleja en la expresión y la actividad aumentada de NADPHO, ya que esta enzima causa una sobreproducción de ROS por esta enzima y por consiguiente altera el estado redox de la célula⁴².

6.2 Efecto del BAL sobre la recuperación de la fatiga

Como mencionamos anteriormente PAO y otros arsenicales son oxidantes específicos de ditioles y por consiguiente forman anillos heterocíclicos con las proteínas que contengan VTGs^{22,43}. BAL, al ser un ditiol, también puede reaccionar con una variedad de arsenicales para formar compuestos cíclicos estables (ditioarsinas). La afinidad del ditiol por el arsénico es tan grande que BAL logra disociar al arsenical de su unión con otras proteínas de manera competitiva, un efecto que no se observa en monotioles⁴⁴. Fluharty y Sanadi (1960) demostraron que BAL logra revertir el efecto inhibitorio de arsenicales sobre la oxidación de glutamato, aseverando que el arsenical afecta preferentemente a ditioles, aún cuando hay un exceso de monotioles en la preparación, siendo esta la razón por la que BAL funciona tan bien para quelar a PAO en comparación con el glutathion (monotiol)⁴⁵.

En experimentos previos de nuestro grupo hemos demostrado que efectivamente BAL logra remover a PAO de SERCA1, una proteína con VTGs²². Nuestros resultados muestran que BAL es eficiente para quelar a PAO, restaurando en gran medida el estado óptimo del músculo, sin embargo no llega

a ser tan eficiente como en otros estudios. Esto lo atribuimos simplemente al hecho de que BAL y PAO están en una relación 1:1, mientras que en estudios previos la relación es de 10:1^{22,45}.

6.3 Efecto del glutatión sobre la recuperación de la fatiga

En el Retículo Sarcoplásmico (RS), la pareja GSH/GSSG regula de manera dinámica el estado redox. Para esto, el GSH es transportado dentro del RS mientras que el GSSG es acumulado y retenido dentro del RS⁴⁶. Esto hace que el cociente GSH/GSSG disminuya a 4:1 (potencial= -208 mV), promoviendo un ambiente oxidante dentro del RS en comparación con el cociente de 6: 1 (potencial = -300mV) en el citosol que le confiere un ambiente altamente reductor de manera similar a la mitocondria donde se encuentra el 15% del GSH celular en una proporción de 38:1^{47,48}.

En particular, GSH sirve como sustrato de la glutatión peroxidasa, enzima encargada de reducir peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y otros peróxidos lipídicos⁴⁹; aunque por si solo es capaz de neutralizar al radical hidroxilo ([•]OH)⁵⁰.

Ya que la actividad muscular promueve la aparición de ROS¹⁹ y éstos pueden tener un efecto negativo en el músculo²¹, parecería que el glutatión podría contrarrestar esto, sobre todo en músculo sóleo donde los niveles de GSH y glutatión total (GSH y GSSG) son 5 veces mayores en comparación con músculo rápido⁵¹. Además, si consideramos que el músculo EDL tiene una cantidad menor de mitocondrias⁵², también su producción de ROS debería ser menor, lo que le permitiría neutralizar a estos radicales, aún con una menor cantidad total de GSH. Sin embargo nuestros resultados muestran que tanto en EDL como en sóleo el glutatión tiene un efecto nulo o mínimo en la recuperación de la fatiga.

En un estudio reciente demostraron que la suplementación con glutatión amortigua levemente el descenso del pH muscular y disminuye la producción de lactato 30 minutos después de terminar un periodo de entrenamiento. Los autores mencionan que esto es evidencia para aseverar que el glutatión puede prevenir la fatiga muscular⁵³. Sin embargo nosotros creemos que sus resultados sólo reflejan un desequilibrio redox, aumentando el potencial reductor del organismo y por lo tanto interfiriendo en la producción de lactato y su consecuente disminución del pH; consecuencias sin relación con la fatiga.

Por otro lado, en ratones suplementados con una sola dosis de GSH y posteriormente expuestos a nado forzado exhaustivo, no se modificó el tiempo de aparición de la fatiga⁵⁴. De manera similar, otros reportes indican que la administración de GSH o N-acetil cisteína no mejora el tiempo a fatiga en ratones⁵⁵.

Por último, y para enfatizar el papel del GSH frente al estrés oxidante con el que debe lidiar el músculo; al exponer el músculo a un estrés oxidante considerable, se observa sólo un papel modesto del glutatión en amortiguar este estrés⁵⁵. Lo anterior nos hace concluir que aunque el glutatión es un actor importante en diversos procesos celulares, no tiene un papel de peso en la fatiga muscular.

6.4 Efecto del α -AL sobre la recuperación de la fatiga

De manera similar al BAL, el α -AL es un ditiol, que además tiene un potencial redox de -320 mV() lo que le permite reducir con gran facilidad una serie de compuestos incluyendo al glutatión y otros tioles²⁷. Considerado un antioxidante casi ideal, el α -AL y su pareja redox, DHLA, cumplen con una variedad de funciones como la neutralización de diversas especies reactivas como el peróxido de hidrógeno, el oxígeno monoatómico, el radical hidroxilo, los radicales de óxido nítrico, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito y el radical peroxil. A su vez tienen una acción antioxidante al ser

quelantes de metales de transición y también tienen la capacidad de reciclar a las vitaminas E y C (revisado en Packer, 2001)³⁴. Todo lo anterior lo ha convertido en un agente terapéutico relacionado a diversas enfermedades como la diabetes, aterosclerosis, resistencia a la insulina, enfermedades neurodegenerativas y otras enfermedades crónicas³⁴. Sin embargo, en nuestros experimentos, parece que la verdadera acción del α -AL se da por su estructura (ditiol) más que por cualquiera de las funciones anteriores. De hecho, postulamos que el α -AL funciona de manera idéntica a BAL, donde PAO tiene una gran atracción por el ditiol, lo que haría que el arsenical sea removido por el α -AL, permitiendo que las proteínas oxidadas volvieran a su estado óptimo (reducido).

Stocken y Thompson postulan que la protección ante arsénicos trivalentes se daría por la presencia de un ditiol capaz de formar un anillo relativamente estable con el arsenical⁴⁴, algo que el α -AL sería capaz de promover. Esto nos indica que el α -AL remueve a PAO por la interacción de este último con el ditiol del primero, poniendo en segundo plano las funciones antioxidantes del α -AL.

6.5 El α -AL acentúa la fatiga en ausencia de PAO en el músculo rápido

El α -AL y su forma reducida, DHLA no se encuentran suspendidas en la célula, sino unidas a distintas enzimas principalmente en la mitocondria, sin embargo la suplementación con estos compuestos permite su permanencia libre en diversos tejidos⁵⁷. Esto abre la posibilidad de que el α -AL exógeno realice funciones intracelulares al afectar el estado redox de proteínas con VTGs y fungiendo como antioxidante, funciones que probablemente no tendría *in vivo* en las concentraciones basales.

Esto justamente podría ser la clave para entender el efecto negativo del α -AL en ausencia de PAO en músculo estimulado. En particular, se podría ver este efecto en RyR. Este canal se encuentra en el RS, el cual tiene un ambiente redox más oxidante que el resto de la célula²⁶. Esto lo que haría es dar un equilibrio redox particular en la cantidad de tioles oxidados o reducidos en RyR, donde se postula

un modelo en el que ciertas cisteínas de RyR deben encontrarse oxidadas para que se de una función óptima de canal de Ca^{2+} ⁵⁸. Si se llegan a reducir estas cisteínas, debido a un desequilibrio redox, por ejemplo al poner agentes reductores como GSH, Ditiotritol (DTT) o BAL, se inhibe la actividad de RyR³, lo que en consecuencia repercutiría en un desacoplamiento del ciclo de excitación-contracción, resultando en fatiga. Es probable que el exceso de α -AL altere el ambiente redox del RS, sobre todo si consideramos su capacidad para atravesar membranas por sus características anfipáticas³³. Así, la entrada de α -AL al RS modificaría el potencial redox causando una inhibición de RyR de manera muy similar a GSH, DTT o BAL. Sin embargo, RyR no es necesariamente la única proteína que podría salir afectada por este cambio en el estado redox del músculo, otras proteínas VTGs o sensores redox también podrían ser afectadas, lo que se reflejaría en una función reducida del músculo.

7. Perspectivas

Una hipótesis completa de las causas y la reversibilidad de la fatiga aún está lejos de nuestro alcance debido a la complejidad del fenómeno y a lo elusivo de los actores involucrados. Con base en la hipótesis redox de la fatiga, enfocada en el papel de los tioles vecinales, nuestros experimentos arrojan algunos resultados útiles para delinear un poco más este fenómeno. Y enlistaremos tales puntos a continuación:

- 1) Comúnmente se postula que la fatiga puede ser inducida por ROS y RNS y existen múltiples reportes al respecto^{20,21}. Si este fuera por completo el caso, parecería que adicionar compuestos quelantes de estas especies reactivas debería prevenir o al menos disminuir la fatiga. En nuestros experimentos hemos observado cómo la administración de DHLA en músculo aislado no logra prevenir la fatiga, aún teniendo en cuenta su poderoso acción como antioxidante^{29,30}. Es por esto que planteamos que debería haber otros actores involucrados o que las ROS y RNS estén interactuando con intermediarios y que éstos serían en realidad los que llegasen a oxidar a las proteínas clave y den como resultado la fatiga muscular.
- 2) Aunque la fatiga inducida por PAO es un fenómeno artificial, sí parece indicar que en la fatiga “normal” algún otro compuesto se está uniendo a los tioles vecinales y oxidándolos. Además de que no conocemos qué compuesto(s) realizan esto, no sabemos si se quedan unidos formando algún tipo de anillo o si después de oxidar a los VTGs son liberados.
- 3) BAL ha sido un compuesto altamente eficaz en remover arsenicales desde su origen hace más de 70 años⁴⁴, y ahora nosotros sumamos el α -AL también como un quelante de arsenicales. Tomando en cuenta el punto anterior, lo que BAL y α -AL aportan es un modelo de reversión de fatiga. Parecería que más que interactuar directamente con VTGs el valor de estas moléculas es

“absorber” el agente oxidante y liberar a los VTGs para que puedan reducirse (¿con algún otro intermediario?) y así restaurar su estado óptimo (reducido).

- 4) Dentro de nuestra búsqueda de una molécula fisiológica que pudiera revertir a la fatiga, hemos excluido la acción de una serie de enzimas que también son claves para el equilibrio redox en proteínas como son las glutarredoxinas y tiorredoxinas. Estas proteínas reductoras (que se “recargan” mediante GSH y DHLA) podrían tener un papel en la reversión de la fatiga, quedando la propuesta para futuras investigaciones.

8. Resumen gráfico

La Figura 14, corresponde a un resumen gráfico de nuestra propuesta de un modelo de fatiga con base en nuestros resultados e hipótesis. En la Figura 14 A se representa el estado de un músculo en reposo. Aquí los VTGs de las proteínas musculares se encontrarían reducidas y por lo tanto adquieren su configuración inactiva. Durante la fatiga fisiológica (Figura 14B) se representa la oxidación de los VTGs, sin embargo, aún no conocemos a la(s) molécula(s) responsable(s) de tal oxidación (?) además no está claro si estas se mantienen unidas a los ditiolos formando un anillo o simplemente se favorece la formación de un disulfuro y se desprenden(?). Tras un periodo de tiempo el músculo se recupera, sin embargo, compuestos como el DHLA y GSH no logran revertir la fatiga, por lo que parecería que otra molécula es la encargada de este proceso (?)(Figura 14 C).

En la fatiga potenciada por PAO (Figura 14 D), el arsenical forma un anillo que oxida a los VTGs. Tanto BAL como DHLA logran remover esta interacción y favorecen la reducción de los VTGs, revirtiendo la fatiga (Figura 14 E). Es claro que el α -AL es un ditiol biológico que protege a las proteínas de una oxidación selectiva de VTGs en presencia de PAO. La ausencia de efecto del α -AL sobre la fatiga en ausencia de PAO a diferencia de BAL, sugiere que las dimensiones del ditiol presente es una estructura inadecuada para revertir a la fatiga, por lo que debe(n) existir otra(s) molécula(s) con mayor especificidad para reducir los VTGs de las proteínas reguladas por tiolación.

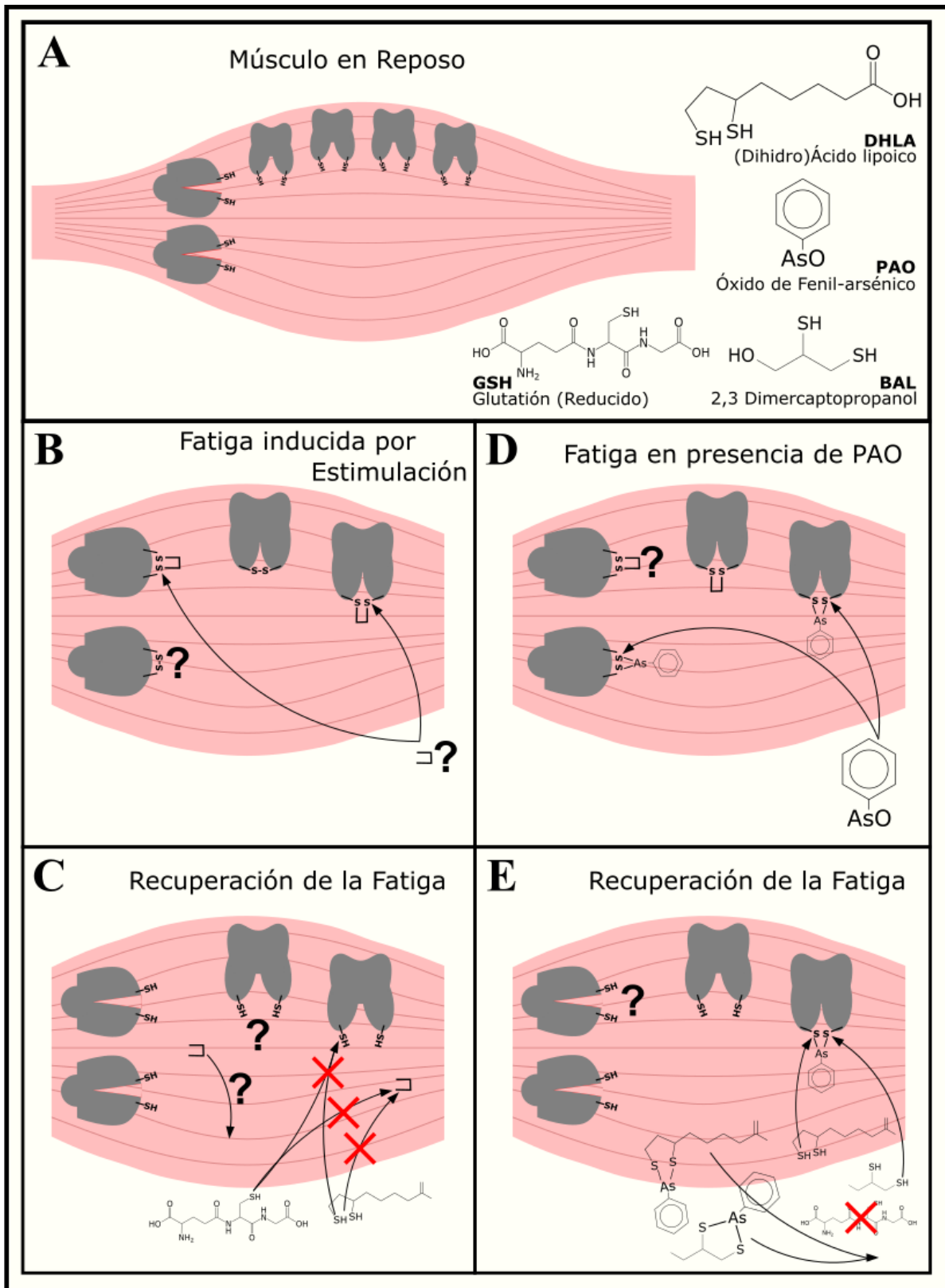


Fig 14. Modelo propuesto de Fatiga

9. Conclusiones

La presencia de cisteínas en moléculas sencillas como el glutatión y el ácido lipoico se encargan de cumplir diferentes funciones celulares, principalmente regulando el ambiente redox intracelular; son sistemas ubicuos en la biología. Este sistema de antioxidantes actúa como donador de electrones mediante la formación y ruptura de enlaces disulfuro. Las proteínas encargadas de regular procesos específicos tanto en vías de señalización como en rutas metabólicas contienen una cantidad importante de cisteínas. El motivo proteico Cys-X_{n=2-6}-Cys (tiol vecinal) reviste especial importancia por la especificidad para oxidar y reducir simultáneamente a estas cisteínas adyacentes y conseguir cambios conformacionales en las proteínas. En el músculo esquelético, particularmente en las FR, la fatiga las incapacita transitoriamente de manera fisiológica para desarrollar fuerza de contracción. En un sistema aislado, la fatiga se exagera induciendo la formación de ditioarcinas en las proteínas con VTGs. La hipótesis que plantea nuestro grupo de investigación es que las proteínas con VTGs están involucradas en el mecanismo molecular de la fatiga y sugerimos a los ditioles, y no a los monotioles, como los antioxidantes participantes en el proceso. Nuestros resultados demuestran que el GSH no tiene un papel relevante en la fatiga al no revertir este fenómeno con o sin PAO, aún cuando el GSH está presente en altas concentraciones en el protocolo experimental además de ser el antioxidante más abundante en la célula, lo que indica que la regulación de la fatiga es un proceso más discreto y más específico.

Por otro lado, el α -LA tiene un papel en la reversión de la fatiga cuando ésta es exacerbada por la formación de ditioarsinas. Es importante destacar que aún como reductor de VTGs, el α -AL no es la molécula encargada de realizar esta función en el músculo sano. La búsqueda

del mecanismo de oxidación y del sistema antioxidante involucrados en la fatiga muscular como proceso fisiológico aún continúa.

10. Referencias

1. Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96(3), 183-195.).
2. Pedersen, B. K., Steensberg, A., & Schjerling, P. (2001). Exercise and interleukin-6. *Current opinion in hematology*, 8(3), 137-141.
3. Sherwood, L. (2015). *Human physiology: from cells to systems*. Ninth Edition. Cengage learning.
4. Martini, F. H. (2001). *Fundamentals of anatomy and physiology* (5th ed.). New Jersey: Prentice Hall.
5. Álvarez, R., Vázquez, P., Pérez, F., Jiménez, A., Tirado, A., Irlés, C., ... & Ortega, A. (2009). Regulation of fast skeletal muscle activity by SERCA1 vicinal-cysteines. *Journal of muscle research and cell motility*, 30(1-2), 5.
6. Staron, R.S., 1997. Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Can. J. appl.physiol.* 22, 307±327.
7. Schiaffino, Stefano, & Reggiani, Carlo (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of applied physiology*, 77(2), 493-501.
8. Periasamy, M., & Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 35(4), 430-442.
9. Fitts, R. H. (1994). Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiological reviews*, 74(1), 49-94
9. Hogan, M. C., Gladden, L. B., Kurdak, S. S., & Poole, D. C. (1995). Increased [lactate] in working dog muscle reduces tension development independent of pH. *Medicine and science in sports and exercise*, 27(3), 371-377.

10. Spangenburg, E. E., Ward, C. W., & Williams, J. H. (1998). Effects of lactate on force production by mouse EDL muscle: implications for the development of fatigue. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 76(6), 642-648.
11. Posterino, G. S., Dutka, T. L., & Lamb, G. D. (2001). L (+)-lactate does not affect twitch and tetanic responses in mechanically skinned mammalian muscle fibres. *Pflügers archiv*, 442(2), 197-203.
12. Sahlin, K., Harris, R. C., Ny Lind, B., & Hultman, E. (1976). Lactate content and pH in muscle samples obtained after dynamic exercise. *Pflügers archiv*, 367(2), 143-149.
13. Baker, A. J., Carson, P. J., Miller, R. G., & Weiner, M. W. (1994). Metabolic and nonmetabolic components of fatigue monitored with ³¹P-NMR. *Muscle & Nerve: Official journal of the american association of electrodiagnostic medicine*, 17(9), 1002-1009
14. Nocella, M., Cecchi, G., & Colombini, B. (2017). Phosphate increase during fatigue affects crossbridge kinetics in intact mouse muscle at physiological temperature. *The journal of physiology*, 595(13), 4317-4328.
15. Nelson, C. R., & Fitts, R. H. (2014). Effects of low cell pH and elevated inorganic phosphate on the pCa-force relationship in single muscle fibers at near-physiological temperatures. *American journal of physiology-cell physiology*, 306(7), C670-C678.
16. Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology and medicine*, 30(11), 1191-1212.

17. Gutscher, M., Pauleau, A. L., Marty, L., Brach, T., Wabnitz, G. H., Samstag, Y., ... & Dick, T. P. (2008). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nature methods*, 5(6), 553.
18. Ferreira, L. F., & Reid, M. B. (2008). Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *Journal of applied physiology*, 104(3), 853-860.
19. Patwell, D. M., McArdle, A., Morgan, J. E., Patridge, T. A., & Jackson, M. J. (2004). Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free radical biology and medicine*, 37(7), 1064-1072.
20. Gutiérrez-Martín, Y., Martín-Romero, F. J., Iñesta-Vaquera, F. A., Gutiérrez-Merino, C., & Henao, F. (2004). Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase by chronic and acute exposure to peroxynitrite. *European journal of biochemistry*, 271(13), 2647-2657.
21. Gitler C, Mogyoros M, Kalef E (1994) Labeling of protein vicinal dithiols: role of protein-S₂ to protein-(SH)₂ conversion in metabolic regulation and oxidative stress. *Methods enzymol* 233:403–415
22. Vázquez, P., Tirado-Cortés, A., Álvarez, R., Ronjat, M., Amaya, A., & Ortega, A. (2016). Reversible oxidation of vicinal-thiols motif in sarcoplasmic reticulum calcium regulatory proteins is involved in muscle fatigue mechanism. *Cell calcium*, 60(4), 245-255.
23. Biswas, S., Chida, A. S., & Rahman, I. (2006). Redox modifications of protein–thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochemical pharmacology*, 71(5), 551-564.
24. Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free radical biology and medicine*, 45(5), 549-561.

25. Smith, C. V., Jones, D. P., Guenther, T. M., Lash, L. H., & Lauterburg, B. H. (1996). Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicology and applied pharmacology*, 140(1), 1-12.
26. Jocelyn, P. C. (1967). The standard redox potential of cysteine-cystine from the thiol-disulphide exchange reaction with glutathione and lipoic acid. *European journal of biochemistry*, 2(3), 327-331.
27. Dickinson, D. A., & Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), 1019-1026.
28. Suzuki, Y. J., Tsuchiya, M., & Packer, L. (1991). Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free radical research communications*, 15(5), 255-263.
29. Haenen, G. R., & Bast, A. (1991). Scavenging of hypochlorous acid by lipoic acid. *Biochemical pharmacology*, 42(11), 2244-2246.
30. Sen, C. K., Roy, S., Han, D., & Packer, L. (1997). Regulation of cellular thiols in human lymphocytes by α -lipoic acid: A flow cytometric analysis. *Free radical biology and medicine*, 22(7), 1241-1257.
31. Packer, L., Witt, E. H., & Tritschler, H. J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free radical biology and medicine*, 19(2), 227-250.
32. Gorąca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., & Skibska, B. (2011). Lipoic acid—biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological reports*, 63(4), 849-858.
33. Packer, L., Kraemer, K., & Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17(10), 888-895.

34. Fernandes, A. P., & Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(1), 63-74.
35. Hoffman, R. D., & Lane, M. D. (1992). Iodophenylarsine oxide and arsenical affinity chromatography: new probes for dithiol proteins. Application to tubulins and to components of the insulin receptor-glucose transporter signal transduction pathway. *Journal of biological chemistry*, 267(20), 14005-14011.
36. Rohrbach, S., Gruenler, S., Teschner, M., & Holtz, J. (2006). The thioredoxin system in aging muscle: key role of mitochondrial thioredoxin reductase in the protective effects of caloric restriction?. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(4), R927-R935.
37. Mahmood, D. F. D., Abderrazak, A., El Hadri, K., Simmet, T., & Rouis, M. (2013). The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 19(11), 1266-1303.
38. Periasamy, M., & Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 35(4), 430-442.
39. <https://www.uniprot.org/uniprot/O55143>
40. Sattar, A., Xie, S., Hafeez, M. A., Wang, X., Hussain, H. I., Iqbal, Z., ... & Yuan, Z. (2016). Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals. *Environmental toxicology and pharmacology*, 48, 214-224.
41. Hunt, K. M., Srivastava, R. K., Elmets, C. A., & Athar, M. (2014). The mechanistic basis of arsenicosis: pathogenesis of skin cancer. *Cancer letters*, 354(2), 211-219.

42. Bennett, T. A., Edwards, B. S., Sklar, L. A., & Rogelj, S. (2000). Sulfhydryl regulation of L-selectin shedding: phenylarsine oxide promotes activation-independent L-selectin shedding from leukocytes. *The journal of immunology*, 164(8), 4120-4129.
43. Stocken, L. A., & Thompson, R. H. S. (1946). British anti-lewisite: 3. Arsenic and thiol excretion in animals after treatment of lewisite burns. *Biochemical journal*, 40(4), 548.
44. Fluharty, A., & Sanadi, D. R. (1960). Evidence for a vicinal dithiol in oxidative phosphorylation. *Proceedings of the national academy of sciences*, 46(5), 608-616.
45. Bánhegyi, G., Lusini, L., Puskás, F., Rossi, R., Fulceri, R., Braun, L., ... & Benedetti, A. (1999). Preferential Transport of Glutathione versus Glutathione Disulfide in Rat Liver Microsomal Vesicles. *Journal of biological chemistry*, 274(18), 12213-12216.
46. Birk, J., Meyer, M., Aller, I., Hansen, H. G., Odermatt, A., Dick, T. P., ... & Appenzeller-Herzog, C. (2013). Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *J cell sci*, jcs-117218
47. Giustarini, D., Colombo, G., Garavaglia, M. L., Astori, E., Portinaro, N. M., Reggiani, F., ... & Milzani, A. (2017). Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free radical biology and medicine*, 112, 360-375.
48. Cohen, G., & Hochstein, P. (1963). Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, 2(6), 1420-1428.
49. Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 222(3), 283-292.

50. Ji, L. L., Fu, Ronggen, & Mitchell, E. W. (1992). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *Journal of applied physiology*, 73(5), 1854-1859.
51. Aoi, W., Ogaya, Y., Takami, M., Konishi, T., Sauchi, Y., Park, E. Y., ... & Higashi, A. (2015). Glutathione supplementation suppresses muscle fatigue induced by prolonged exercise via improved aerobic metabolism. *Journal of the international society of sports nutrition*, 12(1), 7.
52. Zierath, J. R., & Hawley, J. A. (2004). Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS biology*, 2(10), e348.
53. Novelli, G. P., Falsini, S., & Bracciotti, G. (1991). Exogenous glutathione increases endurance to muscle effort in mice. *Pharmacological research*, 23(2), 149-155.
54. Sen, C. K., Atalay, Mustafa, & Hanninen, O. S. M. O. (1994). Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *Journal of applied physiology*, 77(5), 2177-2187.
55. Magalhães, J., Ascensão, A., Soares, J. M., Ferreira, R., Neuparth, M. J., Marques, F., & Duarte, J. A. (2005). Acute and severe hypobaric hypoxia increases oxidative stress and impairs mitochondrial function in mouse skeletal muscle. *Journal of applied physiology*, 99(4), 1247-1253.
56. Podda, M., Tritschler, H. J., Ulrich, H., & Packer, L. (1994). α -Lipoic acid supplementation prevents symptoms of vitamin E deficiency. *Biochemical and biophysical research communications*, 204(1), 98-104.

57. Abramson, J. J., & Salama, G. (1989). Critical sulfhydryls regulate calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 21(2), 283-294.
58. Zable, A. C., Favero, T. G., & Abramson, J. J. (1997). Glutathione Modulates Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum EVIDENCE FOR REDOX REGULATION OF THE Ca²⁺ RELEASE MECHANISM. *Journal of biological chemistry*, 272(11), 7069-7077.