

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



UNIVERSIDAD DE CHILE

**EFFECTOS DEL USO CRÓNICO DE UN ANÁLOGO DE NIFEDIPINO (MP2) EN EL CAMBIO DE
COMPOSICIÓN FENOTÍPICA DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS Y FUNCIÓN MUSCULAR
DE RATONES ADULTOS**

JAVIERA ALBORNOZ BASTIDAS

PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO MAGISTER EN FISIOLÓGÍA

DIRECTORA DE TESIS: MARIANA VICTORIA CASAS ATALA

Fecha: 11.07.22

EFECTOS DEL USO CRÓNICO DE UN ANÁLOGO DE NIFEDIPINO (MP2) EN EL CAMBIO DE COMPOSICIÓN FENOTÍPICA DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS Y FUNCIÓN MUSCULAR DE RATONES ADULTOS

TESIS PARA GRADO DE MAGISTER EN FISIOLÓGÍA

Por

Javiera Albornoz Bastidas

Directora de tesis:

Dra. Mariana Victoria Casas Atala

Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	19
OBJETIVO	
GENERAL.....	19
OBJETIVOS	
ESPECÍFICOS.....	19
DISEÑO EXPERIMENTAL Y	
MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIÓN.....	71
ANEXO 1.....	74
ANEXO 2.....	80
ANEXO 3.....	84
ANEXO 4.....	85
BIBLIOGRAFÍA.....	86

ABREVIACIONES

MyHC I	<i>Cadena pesada de miosina tipo I</i>
MyHC IIa	<i>Cadena pesada de miosina tipo IIa</i>
MyHC IIx	<i>Cadena pesada de miosina tipo IIx</i>
MyHC IIb	<i>Cadena pesada de miosina tipo IIb</i>
Tnl	<i>Troponina inhibitoria lenta</i>
Tnif	<i>Troponina inhibitoria rápida</i>
<i>Eno3</i>	<i>Gen de enzima enolasa</i>
<i>myh2</i>	<i>Gen de la cadena pesada de miosina tipo IIa</i>
<i>myh1</i>	<i>Gen de la cadena pesada de miosina tipo IIb</i>
<i>myh7</i>	<i>Gen de la cadena pesada de miosina tipo IIx</i>
SDH	<i>Enzima succinato deshidrogenasa</i>
CBX	<i>Carbenoxolona</i>
SOL	<i>Sóleo</i>
TA	<i>Tibial anterior</i>
GAS	<i>Gastrocnemio</i>
CUA	<i>Cuádriceps</i>
<i>I.P.</i>	<i>Inyección Intraperitoneal</i>

RESUMEN

Los cambios adaptativos que se reflejan en las variaciones de estructura y función muscular se denomina plasticidad muscular. La respuesta adaptativa es específica y depende de la frecuencia de repeticiones del estímulo, el grado de carga y número de contracciones musculares, traduciéndose en la expresión diferencial de genes en la fibra muscular. En fibras musculares adultas, patrones de estimulación de baja frecuencia, como los que se observan con el ejercicio de larga duración y baja intensidad, se asocian con la salida de ATP hacia el medio extracelular a través del canal Panxina-1 (Panx-1). La despolarización de la membrana muscular es detectada por el canal Cav1.1, el cual, a bajas frecuencias, activa (por un mecanismo aún no descrito) al canal Panx-1 produciéndose la liberación de ATP al medio extracelular. Este ATP extracelular puede ahora activar vías de receptores purinérgicos y cascadas de señalización que conducen a la expresión de genes marcadores de un fenotipo lento. Por esta razón, en este trabajo de investigación estudiamos qué sucede con la expresión de estos genes cuando la salida de ATP está bloqueada de manera crónica.

En el laboratorio de Fisiología Celular del Músculo, se ha desarrollado un nuevo fármaco, MP2, que pertenece a la familia de las dihidropiridinas. MP2 interactúa con Cav1.1, de tal forma que éste ya no puede activar al canal Panx-1 luego de un estímulo eléctrico, inhibiendo la liberación de ATP al medio extracelular, así como también los aumentos de los mRNA de genes asociados al fenotipo lento. Se demostró que MP2 produce la normalización de los niveles de ATP extracelular y promueve la recuperación de la función muscular en fibras de ratones envejecidos, en los cuales los niveles de ATP extracelular se encuentran elevados. Además, datos previos a esta tesis indican que MP2 no actúa como un inhibidor de la vasoconstricción en venas intrapulmonares de rata, a diferencia del nifedipino, por ejemplo. Dado el efecto sobre la función muscular en ratones envejecidos, se quiso estudiar el efecto de un uso crónico de MP2 sobre la función y el fenotipo de ratones adultos sanos. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el

tratamiento crónico vía inyección intraperitoneal con MP2 en ratones adultos sanos, no produce cambios significativos en la función muscular, si bien existe una tendencia al alza en la capacidad de producir fuerza de ratones tratados con MP2. Además, no se observaron cambios en la abundancia relativa de los transcritos de genes contráctiles de las fibras musculares esqueléticas estudiadas (Troponinas inhibitorias lentas y rápidas y las distintas cadenas pesadas de miosina) y, tampoco de una enzima glicolítica (Enolasa). Finalmente, la actividad enzimática oxidativa de SDH de los animales tratados crónicamente con MP2 no se vio significativamente disminuida. Los resultados demuestran que el uso crónico de MP2 en ratones adultos sanos no modula de manera significativa ni la función y ni el fenotipo muscular, mostrando una tendencia hacia un aumento de fuerza y un cambio fenotípico hacia rápido en un músculo predominantemente lento (Sóleo). Dada la variabilidad de los resultados, es necesario realizar este estudio con un mayor número de individuos.

ABSTRACT

The adaptive changes that are reflected in the variations of muscle structure and function are called muscle plasticity. The adaptive response is specific and depends on the frequency of repetitions of the stimulus, the degree of load and number of muscle contractions, resulting in differential gene expression in the muscle fiber. In adult muscle fibers, low frequency stimulation patterns, such as those observed with long duration and low intensity exercise, are associated with the outflow of ATP into the extracellular medium through the Panxin-1 (Panx-1) channel. Depolarization of the muscle membrane is detected by the Cav1.1 channel, which, at low frequencies, activates (by a mechanism not yet described) the Panx-1 channel resulting in the release of ATP into the extracellular medium. This extracellular ATP can now activate purinergic receptor pathways and signaling cascades leading to the expression of marker genes for a slow phenotype. For this reason, in this research work we studied what happens to the expression of these genes when ATP output is chronically blocked.

In the Muscle Cell Physiology laboratory, we have developed a new drug, MP2, which belongs to the dihydropyridine family. MP2 interacts with Cav1.1 in such a way that the latter can no longer activate the Panx-1 channel after an electrical stimulus, inhibiting the release of ATP into the extracellular medium, as well as the increases in mRNA of genes associated with the slow phenotype. MP2 was shown to produce normalization of extracellular ATP levels and promote recovery of muscle function in aged mouse fibers in which extracellular ATP levels are elevated. Furthermore, data prior to this thesis indicate that MP2 does not act as an inhibitor of vasoconstriction in rat intrapulmonary veins, unlike nifedipine, for example. Given the effect on muscle function in aged mice, we wanted to study the effect of chronic use of MP2 on the function and phenotype of healthy adult mice. The results obtained in this work showed that chronic treatment via intraperitoneal injection with MP2 in healthy adult mice does not produce significant changes in muscle function, although there is an upward trend in the ability to produce force in mice treated with MP2. In addition, no changes were observed in the relative abundance of the

contractile gene transcripts of the skeletal muscle fibers studied (slow and fast inhibitory troponins and the different myosin heavy chains), nor of a glycolytic enzyme (Enolase). Finally, the oxidative enzymatic activity of SDH in animals chronically treated with MP2 was not significantly decreased. The results demonstrate that chronic use of MP2 in healthy adult mice does not significantly modulate either muscle function or phenotype, showing a trend toward increased strength and a phenotypic shift toward fast in predominantly slow muscle (soleus). Given the variability of the results, it is necessary to perform this study with a larger number of individuals.

INTRODUCCIÓN

1. Plasticidad Muscular.

La unidad funcional del sistema motor, la unidad motora, se compone por una motoneurona y el conjunto de fibras musculares que esta innerva. Un aumento de la demanda física causa el reclutamiento selectivo de unidades motoras, que permiten responder selectivamente con aumentos de fuerza, resistencia y/o velocidad. Así, un mismo músculo es funcionalmente flexible, capaz de responder tareas tan distintas como mantener la postura (baja intensidad), caminar o correr (ejercicios sub maximales) y saltar o patear (ejercicio de alta intensidad y contracciones máximas) (Schiaffino & Reggiani, 2011). Aunque las fibras que componen un mismo músculo tienen algún grado de heterogeneidad, presentan características funcionales similares (Blaauw et al., 2013). Además, el músculo esquelético es un tejido capaz de sufrir modificaciones estructurales y funcionales en respuesta a los cambios crónicos en su demanda (Schiaffino & Reggiani, 2011). Esta capacidad de adaptación se conoce como “plasticidad” y se manifiesta como variaciones de fuerza, resistencia y velocidad contráctil en respuesta a diversos tipos de estímulo crónico, lo que implica el cambio del fenotipo muscular y de las fibras que lo componen (Tavi & Westerblad, 2011).

La actividad nerviosa es el determinante principal del fenotipo de la fibra, (Schiaffino & Reggiani, 2011). La caracterización de los distintos fenotipos de fibra muscular esquelética se ha ido desarrollando desde una idea básica (fibras rojas y blancas; rápidas o lentas), hasta el reconocimiento de la existencia de 4 grupos de fibras con distintas propiedades contráctiles, metabólicas y estructurales (Schiaffino & Reggiani, 2011): 1, 2A, 2X 2B. Estos 4 tipos de fibras pueden distribuirse de manera diversa en los músculos de las extremidades, tronco y la cabeza de los mamíferos, y su proporción puede variar entre sujetos y especies (Schiaffino & Reggiani, 2011). De acuerdo a la actividad y demandas funcionales de los músculos en el tiempo, cambios plásticos permiten que la abundancia relativa de fibras de un fenotipo u otro pueda modificarse.

2. Componentes de la Fibra Muscular y el Fenotipo

La abundancia relativa de proteínas sarcoméricas determinan la función y la estructura de las fibras, permitiendo además reconocer los diferentes fenotipos musculares. La miosina es la principal proteína que impulsa la generación de la fuerza, es decir, es el motor molecular. En general, la miosina representa un 25% del total de proteínas musculares. La miosina sarcomérica forma un hexámero: dos cadenas pesadas (MyHC) y dos pares de cadenas livianas (MyLC). Tanto MyHC como MyLC se presentan en los diferentes músculos en distintas isoformas con distribución diferencial según el fenotipo de la fibra. Las isoformas de MyHC son las que permiten la clasificación de acuerdo al tipo de fibra. Las miosinas de clase 2 (MyHC-2A, MyHC-2x y MyHC-2B) son codificadas por distintos genes: myh2, myh1 y myh4 respectivamente; la miosina lenta, MyHC-1, por su parte es codificada por el gen myh7. De manera general, las fibras tipo 1 se reconocen como lentas debido su lenta velocidad de contracción y resistencia a la fatiga, producto de la predominancia de un metabolismo oxidativo en estas fibras. En contraste, las fibras tipo 2a se reconocen como fibras intermedias, que presentan una rápida velocidad de contracción y metabolismo mixto (oxidativo/glucolítico). Finalmente, las fibras de tipo 2x y 2b se reconocen como fibras de contracción rápida, capaces de producir altos niveles de fuerza, poco resistentes a la fatiga y donde predomina el metabolismo glucolítico (Qaisar et al., 2016).

La troponina es otra proteína sarcomérica que también conforma el motor molecular de la fibra muscular. En los músculos esqueléticos y cardíacos, el proceso contráctil está regulado por la unión de Ca^{2+} a la troponina C- que pertenece a un complejo de tres proteínas troponinas (TnC, TnI, TnT)- produciendo una serie de cambios alostéricos en el filamento delgado que desencadenan en la contracción muscular (Brotto et al., 2006). La troponina I (TnI) es la subunidad inhibitoria del complejo de troponinas en el filamento delgado del músculo estriado y desempeña un papel central en la regulación del papel que juega el calcio en la contracción y la relajación muscular esquelética. Se han descrito tres isoformas de troponina I codificadas por tres genes homólogos: tnni1 para la TnI de las fibras lentas (TnIs), tnni2 para la TnI

de fibras rápidas (Tnlf) y tnni3 para Tnl de las fibras musculares cardíacas (de Matteis et al., 2019). Junto con las isoformas de miosina, las distintas isoformas de troponinas I (Tnl) son utilizados como marcadores importantes de los cambios transcripcionales producidos en los procesos de plasticidad muscular, permitiendo caracterizar las fibras musculares y los distintos músculos esqueléticos (Jorquera et al., 2013; Schiaffino & Reggiani, 2011).

3. Mecanismos de Plasticidad Muscular.

El cambio del fenotipo muscular implica la reprogramación de la transcripción génica que se traduce en remodelación de las propiedades contráctiles de la fibra (transición entre lento y rápido) y de su perfil metabólico (oxidativo-glicolítico) (Blaauw et al., 2013a). Las motoneuronas, que provocan diferentes patrones de despolarización, son el principal estímulo para esta reprogramación génica y fenotípica. (Calvo et al., 1996). La evidencia de la importancia de la innervación y más específicamente del patrón de estimulación proveniente de la motoneurona se ha obtenido a lo largo de los años. Así, encontramos: i) patrón de descarga de la motoneurona o estimulación eléctrica externa; ii) reinervación cruzada; iii) patrón neural de estimulación; iv) transección de la médula espinal; v) carga y descarga; vi) actividad e inactividad, incluyendo entrenamiento de resistencia, entrenamiento aeróbico, desentrenamiento, desuso, reposo, reposo en cama, ULLS o suspensión unilateral de las extremidades, microgravedad y vuelo espacial, hibernación y estivación. Otros factores pueden también afectar el fenotipo muscular como las hormonas tiroideas, glucocorticoides, testosterona, y beta agonistas; la disponibilidad de oxígeno y sustrato en condiciones de: ayuno, diabetes, dieta alta en grasas o hipoxia (Blaauw et al., 2013). A nivel celular, los cambios en la reprogramación de las fibras musculares desde un fenotipo rápido a lento se asocian con cambios de las isoformas de miosina, que ocurren siguiendo la secuencia: 2B→2x→2A→1; el cambio desde un fenotipo lento a rápido ocurriría con la secuencia: 1→12A→2x→2B. Un cambio de fenotipo lento a rápido, en dirección 1→2A→2X→2B, puede ser inducido por: envejecimiento, estimulación

eléctrica fásica de alta frecuencia, por la descarga muscular causada por la suspensión de las extremidades posteriores, por el desuso, por la microgravedad y/o por el hipertiroidismo (Blaauw et al., 2013). En contraste, un cambio de rápido a lento en la dirección opuesta (2B→2X→2A→1), puede ser inducido por la estimulación eléctrica crónica de baja frecuencia, que se asemeja al patrón de disparo de las motoneuronas que inervan fibras lentas, por sobrecarga muscular, y/o el hipotiroidismo (Blaauw et al., 2013).

El ejercicio físico como un estímulo externo, es capaz de generar cambios en las características del músculo esquelético y la estructura de la fibra muscular. Por ejemplo, el entrenamiento repetitivo de baja carga tendrá como resultado la diferenciación de fibras musculares hacia un fenotipo de resistencia a la fatiga (Pette & Vrbovn, 1992.); en contraste, los regímenes de ejercicio de alta intensidad, que provocan un alto grado de carga sobre el músculo esquelético, resultarán en un aumento de la fuerza a través de la hipertrofia de la fibra y una disminución en la resistencia a la fatiga (Flück, 2006), predominando el fenotipo rápido de las fibras. Los cambios fenotípicos involucran cambios en la expresión de proteínas contráctiles así como a cambios del metabolismo celular. Las unidades motoras compuestas por fibras lentas han mostrado tener mayor actividad de la enzima oxidativa Succinato Deshidrogenasa (SDH), siendo más resistentes la fatiga; las unidades motoras compuestas por fibras rápidas, presentan mayor actividad de enzimas glucolíticas (ej: Enolasa, GAPDH) y mayor capacidad de producir fuerza pero en períodos acotados de tiempo (10-30 segundos) (Blaauw et al., 2013).

4. Papel del canal de calcio tipo L (Cav1.1) en el acoplamiento excitación-contracción y excitación-transcripción.

Se ha propuesto que las respuestas adaptativas del músculo esquelético y los consiguientes cambios estructurales, dependen de patrones específicos en las variaciones periódicas de la concentración de calcio libre intracelular, que son desencadenadas en respuesta a distintos tipos de estímulo (Carrasco et al., 2003). En la misma línea, se ha postulado que los cambios en la concentración de Ca^{2+}

son un espejo de la actividad contráctil de la fibra muscular, pues en cada sacudida, el Cav1.1 activa la liberación masiva de Ca^{2+} a través de canales de RyR1. Esta función primaria del Cav1.1 es la de sensor de cambios de potencial en la membrana que permiten una activación física del canal RyR1, la salida masiva de Ca^{2+} al medio intracelular y la contracción de la fibra. Este proceso se conoce como acoplamiento excitación-contracción (ECC) (Hernández-Ochoa & Schneider, 2018). El canal Cav1.1 pertenece a la familia de canales de calcio dependientes de voltaje (Cav). Estos canales (Cav) son una gran familia de proteínas de membrana que son capaces de cambiar su conformación frente a cambios en los potenciales de membrana. En el caso del canal presente en el músculo esquelético (Cav1.1), la velocidad de apertura del poro es muy lenta, lo que implica que la corriente de entrada de Ca^{2+} a través del canal, no juega un rol en la activación del ECC. Muy brevemente, Cav1.1 es un héterotetrámero, conformado por una proteína formadora de poro (alfa 1), las subunidades beta, alfa2 y gama. Otras proteínas también se pueden asociar al canal, como por ejemplo STAC3. Alfa 1 cuenta con 4 dominios transmembrana (I-IV), altamente homólogos. A su vez, cada dominio tiene 6 segmentos transmembrana (alfa hélice, S1-S6), con extremos N y C intracelulares. Los S5-S6 de todos los dominios contribuyen a formar el poro del canal, mientras que los S1-S4 del dominio I conforman el sensor de voltaje. (Hernández-Ochoa & Schneider, 2018).

Para la activación de contracción el mecanismo descrito a través de la interacción entre Cav1.1 y RyR1 es caracterizado por un aumento rápido de la concentración de Ca^{2+} (señal rápida). Por otra parte, Cav1.1 también es el sensor de cambios en el potencial de membrana en otro proceso: el acoplamiento excitación-transcripción (ETC), en el cual, la actividad despolarizante de la fibra modula la transcripción génica. En el ETC, el Cav1.1 se asocia con receptores de membrana activando vías de señalización involucradas en aumentos de IP3, el cual al unirse a su receptor en el retículo sarcoplasmático (canal de Ca^{2+} activado por unión de IP3), produce nuevos cambios de la concentración de calcio libre intracelular de mayor duración (Casas et al., 2012).

En resumen, los aumentos de la concentración de calcio intracelular rápidos (ECC) y lentos (ECT) comparten su dependencia en la activación del canal Cav1.1 (o DHPR), así como la independencia de la entrada del calcio desde el medio extracelular. El aumento de calcio citosólico en ambas situaciones se origina en las reservas intracelulares, pero por diferentes mecanismos diferentes.

5. La vía DHPR-Panx1-Ca²⁺ media la diferenciación hacia fenotipo de fibra lenta.

Los mecanismos moleculares que median que los cambios en los patrones de estimulación neuromuscular influyen en el fenotipo de fibras musculares lentas o rápidas recién comienzan a ser conocidos. En el año 2010, Casas et al. demostraron que las señales de calcio post-tetánicas en fibras musculares esqueléticas aisladas a partir del músculo FDB de ratones jóvenes eran dependientes del aumento de IP3. La estimulación eléctrica (EE) de baja frecuencia (20 Hz) evoca el aumento rápido de la concentración de calcio intracelular (ECC), seguido de una señal lenta, dependiente de IP3. Además, la estimulación eléctrica causa un aumento de la concentración de ATP extracelular, asociado con la producción de IP3, que ocurre mayormente a bajas frecuencias de estimulación. El aumento de ATP extracelular induce un aumento del ARNm de la isoforma lenta de TnI además de una disminución del ARNm de la isoforma rápida de TnI. El cambio del patrón de expresión génica es dependiente tanto de la activación del IP3R, puesto que era bloqueado por xestopongina (XeB)(Casas et al., 2010), como del canal de Panx1, puesto que Carbenoxolona (CBX), un bloqueador de Panx1, se suprime el aumento del ATP extracelular y los cambios en los niveles de ARNm TnI y TnIs producidos por la estimulación a 20 Hz, (Jorquera et al., 2013).. Estudios en miotubos que no expresan la subunidad alfa1S de Cav1.1 (ratones mdg), mostraron que la liberación de ATP, la activación de receptores purinérgicos y la generación de la señal de Ca²⁺ dependiente de IP3, requieren de la presencia del sensor de voltaje del canal. La dependencia de la activación de la vía de señalización y la acción de Cav1.1 sobre Panx1, se muestra también en el hecho que la incubación de las fibras con dos

dihidropiridinas de estructura muy similar inhiben la salida de ATP luego de un EE a 20 Hz. La preincubación de las fibras con nifedipino (25 μM) (un antagonista de DHPR) o también con (-)SBayK 8644 (agonista de DHPR) disminuyen importantemente la salida de ATP y los cambios transcripcionales asociados a este proceso (Jorquera et al., 2013). Según Araya y cols. (2031) ambas sustancias, nifedipino y (-)SBayK 8644 se unirían al sensor de voltaje de Cav1.1 (Araya et al., 2003), sugiriendo que esta es la estructura/función del canal, permitiendo hipotetizar que este vía sería la responsable de la activación del canal Panx-1 y la consiguiente liberación de ATP. A modo de resumen, el modelo de acoplamiento excitación-transcripción con baja frecuencia de estímulo propuesto en base a estos resultados se presenta en la figura 1.

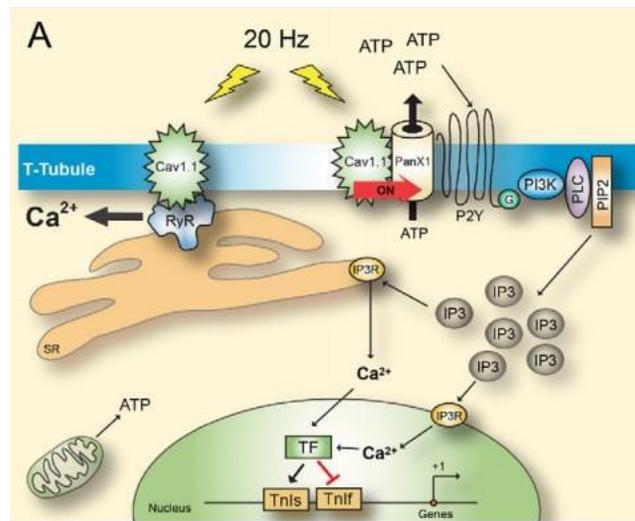


Figura 1. Modelo de trabajo. (A) La estimulación eléctrica de 20 Hz en fibras FDB adultas activa Cav1.1 con cada evento despolarizante. Esta activación, a su vez, induce una liberación rápida de Ca^{2+} a través de RyR1 que provoca la contracción de las fibras musculares. Proponemos que, a esta frecuencia, hay una activación de otra función de Cav1.1 relacionada con la activación de Panx1 que causa la liberación de ATP. Estos eventos desencadenarán a su vez una cascada de señalización donde, a través de la activación de los receptores P2Y, PI3K y PLC, la consecuente producción de Ins (1,4,5) P3 (IP3) en la membrana plasmática inducirá una señal de Ca^{2+} a través de Ins (1,4,5) P3R responsable de la activación de genes relacionados con una transición de fibra muscular de rápida a lenta (Jorquera et al., 2013).

6. Papel de Cav 1.1 en la modulación del fenotipo y función muscular.

El tamaño de los músculos y la función neuromuscular cambian drásticamente a lo largo de la vida. En las etapas iniciales del desarrollo se observa un rápido aumento de la masa muscular (etapa de crecimiento), mientras que con el envejecimiento se produce y una disminución gradual de la masa y función muscular (Vandervoort, 2002). La sarcopenia que se desarrolla con el envejecimiento es una condición progresiva y generalizada del músculo esquelético, caracterizada por una disminución de la fuerza muscular, masa muscular, y finalmente del rendimiento físico (Nikolić M, 2001) . Representa el resultado final de una serie de cambios, como la pérdida de unidades motoras debido a la denervación progresiva, un cambio hacia tipos de fibras más lentas, una alteración de la homeostasis del Ca^{2+} , alteraciones mitocondriales y estrés oxidativo (Fulle et al., 2004; L. Larsson, 1998; Luff, 2006). En general, se atribuye a la reducción del número de fibras tanto de tipo I como de tipo II, más un factor adicional de atrofia de las fibras de tipo II (Ladora V Thompson, 1994). Se cree que la sarcopenia refleja una disminución de la tasa de síntesis de las proteínas musculares mixtas, de las cadenas pesadas de miosina y de las proteínas mitocondriales, más que un exceso de procesos catabólicos (Proctor et al., 1998). Se ha propuesto que una alteración de los mecanismos que controlan la liberación de calcio de las reservas internas (acoplamiento excitación-contracción (ECC) contribuye a la disminución del rendimiento muscular relacionada con la edad que acompaña al envejecimiento (teoría del desacoplamiento del ECC) (Boncompagni et al., 2006). Una reducción en el suministro de Ca^{2+} disponible para desencadenar la contracción muscular puede ser uno de los factores clave para explicar la debilidad muscular relacionada con la edad (Damianil et al., 1996; Delbono et al., 1995; L. Larsson, 1998; Narayanan et al., 1996). Esto, debido a una alteración de los eventos que vinculan el potencial de acción generado en las uniones neuromusculares con la liberación de calcio desde retículo sarcoplásmico (RS), un desacoplamiento entre los DHPR y los RyR1 durante el ECC (Delbono et al., 1995; Renganathan et al., n.d.). Estudios realizados en el laboratorio de la Dra

Casas han mostrado que las fibras musculares de FDB de ratones envejecidos presentan un aumento de la liberación basal (sin estímulo eléctrico) de ATP. El uso de nifedipino disminuyó la salida de ATP (datos no publicados obtenidos en unidad de investigación). En su conjunto, estos resultados sugieren en el envejecimiento se produce una disfunción de la vía Cav1.1-Panx1 que favorece la salida de ATP en condiciones basales, y que el bloqueo de Cav1.1 reduce el eflujo de ATP. Aunque nifedipino es un fármaco con acciones sobre diversos tejidos (músculo liso vascular, cardiomiocitos, músculo liso del tracto digestivo), estos estudios de función muscular en los ratones envejecidos sugieren que nifedipino tendría una acción directa sobre el músculo esquelético, beneficiosa, potenciando los mecanismos fisiológicos de plasticidad muscular (resultados sin publicar, en proceso de patentamiento).

Estudios sobre el efecto del tratamiento con nifedipino en enfermedades músculo esquelético también apoyan la idea de acciones directas y beneficiosas del bloqueo de Cav1.1 sobre la función muscular. La distrofia muscular de Duchenne (DMD), que se produce por mutaciones en el gen que codifica para la proteína distrofina, se presenta con un aumento del influjo de calcio, destrucción progresiva de las fibras musculares, inflamación, estrés oxidativo/nitrosativo y muerte celular (Casas et al., 2012). Estos signos se han asociado con la desregulación de DHPR, que media un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en estado basal y liberación de ATP. El uso de nifedipino en ratones DMD (ratones mdx, carentes de distrofina), utilizado para bloquear DHPR, ha mostrado ser efectivo en la disminución de la liberación de ATP desde la fibra muscular, produciendo cambios fenotípicos asociados a la disminución de la expresión de troponina inhibitoria lenta y a la mejora de la función muscular en pruebas de fuerza y natación (Altamirano et al., 2013).

7. MP2, una nueva molécula de la familia de dihidropiridinas que potencia la plasticidad muscular.

Como mencionamos previamente, las dihidropiridinas, y en particular nifedipino, podrían ser tratamientos farmacológicos para patologías que presentan como característica una elevación del ATP extracelular basal, como la DMD y la sarcopenia.. Sin embargo, como la entrada de calcio a la célula vía un subtipo de Cav es necesaria para la función del músculo liso y cardiaco, el laboratorio de Fisiología Celular del Músculo desarrolló una nueva molécula que al unirse al Cav1.1 modula el ETC pero no altera la función del poro. Muy brevemente, nifedipino es la molécula más utilizada de las familia de las DHP, que clínicamente actúa como vasodilatador y se utiliza en el tratamiento de la hipertensión arterial. Se absorbe casi por completo en el tracto gastrointestinal y se elimina por metabolismo hepático (Raemsch, 1983). El MP2, es un molécula de diseño que también pertenece a la familia de las dihidropiridinas, y también se une a Cav1.1. Estudios electrofisiológicos en fibras musculares muestran que, a diferencia de nifedipino, tiene efectos muy menores sobre la corriente de Ca^{2+} mediada por Cav1.1. Además, la incubación en presencia de MP2 disminuye la liberación basal de ATP desde fibra muscular aislada de ratones adultos, así como la liberación luego de EE a 20 Hz. En ratones envejecidos, restaura los niveles normales de ATP extracelular, mejora la funcionalidad muscular, mejorando la fuerza y la resistencia cardiorrespiratoria en ratones viejos (Resultados preliminares en proceso de patentamiento).

En base a los resultados preliminares y la evidencia que mencionamos, MP2 bloquearía la cascada de señalización que activa el patrón de expresión de genes característicos de la fibra muscular lenta. En consecuencia, el tratamiento prolongado con MP2 impediría esta expresión de genes de fenotipo lento, y quizás potenciaría la expresión de fenotipo de tipo rápido, aumentando la relación fuerza-resistencia en músculo esquelético de ratones adultos (figura 2).

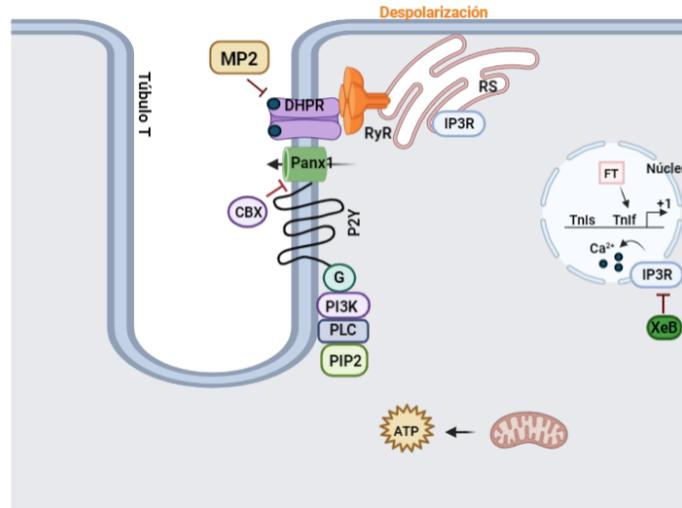


Figura 2. Modelo de transición de fenotipo lento a rápido: Acción de MP2 sobre la expresión de genes lentos y rápidos en la fibra muscular esquelética. Proponemos que la acción de MP2 sobre el canal Cav 1.1 tiene un efecto alostérico sobre el canal Panx 1.1, inhibiendo la salida de ATP a través de este, que en estado basal se encuentra normal en ratones adultos sanos. El uso crónico de MP2 inhibiría la cascada de señalización de genes lentos, promoviendo la expresión de genes rápidos en la célula muscular, representado con un cambio de fenotipo de la fibra muscular esquelética.

Este estudio evaluó los efectos del uso prolongado de MP2 en ratones adultos sanos. Analizamos la función muscular, indicadores de cambios metabólicos en las fibras musculares, y los cambios en el patrón de expresión de genes característicos de los diferentes fenotipos de fibra muscular. Además, considerando que MP2 es una DHP que podría afectar la función del músculo liso vascular, estudiamos su efecto sobre la presión arterial.

HIPÓTESIS:

- El tratamiento crónico *in vivo* con MP2 produce una transición de fibras lentas a rápidas y una mejora en la función muscular de fuerza en ratones adultos.

OBJETIVO GENERAL:

- Medir el efecto del uso crónico de MP2 sobre la expresión génica, la proporción de fibras musculares rápidas y lentas, y sobre la función muscular de ratones adultos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar el efecto de MP2 en los niveles de ARNm de las isoformas lentas y rápidas de troponina I y cadenas pesadas de miosinas (MyHC I, MyHC IIa, MyHC IIx y MyHCIIb).
- Determinar el efecto de MP2 en la proporción de fibras musculares de tipo I, IIa, IIb y IIx y, en los niveles de enzimas SDH, en cortes histológicos de músculos.
- Determinar el efecto de MP2 en pruebas de fuerza, resistencia y función neuromuscular en ratones adultos.
- Determinar el efecto *in vivo* de MP2 sobre la presión arterial en ratones adultos sanos.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS:

Animales:

Ratones macho C57BL/J6 de entre 8 y 10 semanas de edad fueron mantenidos en condiciones controladas de humedad y temperatura (21°C), en un ciclo de 12h luz/oscuridad. La alimentación fue bajo dieta normal a libre demanda. Los experimentos se realizaron bajo los protocolos de bioética del bioterio central de la Facultad de Medicina, con el protocolo de bioética aprobado N° ID16I10101.

Tratamiento con droga: Inyección intraperitoneal:

Se utilizaron ratones machos de 8 y 10 semanas de edad que fueron inyectados diariamente durante 8 semanas con una solución de MP2 (2 mg/Kg de peso corporal) o solución salina con inyección intraperitoneal. El MP2 fue preparado en un tubo ámbar con una proporción de 10 mg/mL en etanol absoluto (MERK) y luego se diluyó en una solución salina estéril (0,9% NaCl) a 0,2 mg/mL por inyección (volumen de inyección en torno a 100 µL).

Prueba de empuñadura invertida con peso (weight test):

La prueba de empuñadura invertida para medir fuerza en ratones se llevó a cabo según se ha descrito anteriormente (Deacon, 2013). La duración total del protocolo fue de 8 semanas, 1-2 veces por semana debido a que es una prueba de comportamiento y, por lo tanto, se buscó evitar el sesgo de aprendizaje. Se puede suponer que cuando el procedimiento se repite con cierta frecuencia, los animales suelen aprender el protocolo y pierden el interés por aplicar resistencia para mantener su agarre. Entonces, la determinación de la fuerza de agarre sobre una base semanal garantizaría resultados imparciales (Aartsma-Rus et al., 2008). El protocolo de fuerza se describe a continuación:

El ratón se sostiene entre el centro y base de la cola y se le acerca a la viruta metálica con peso (20 g total) que está sobre el mesón de trabajo, hasta que lo agarre con sus extremidades. El ratón se levanta junto con el peso sostenido por él

mismo y se mantiene en el aire. Si el ratón es capaz de sostener el peso en el aire durante 5 segundos, quiere decir que es posible aumentar el peso en la misma sesión. Este aumento de peso se realiza una vez que todos los ratones de su misma jaula se hayan evaluado en el primer peso (100% de la masa total del ratón). El peso se aumenta a criterio del evaluador, pero el aumento debe ser leve (aprox. 5 g), con el fin de ir evaluando el peso máximo para esa sesión. El peso nuevo siempre se evalúa con el criterio de los 5 segundos en suspensión. En caso de que el ratón deje caer la viruta con el peso antes de los 5 segundos, se le debe dejar descansar por al menos 60 segundos antes de volver a intentarlo con el mismo peso. Si falla tres intentos con el mismo peso, la prueba se finaliza y se le asigna al ratón el máximo peso sostenido durante 5 segundos en la sesión realizada. En la siguiente sesión, se comienza con el último peso alcanzado en la prueba anterior siempre utilizando el criterio de 5 segundos y 3 intentos (en caso de ser necesario). Desde ahí se continúa agregando pesos hasta alcanzar un nuevo máximo.

Protocolo RotaRod:

Como regla general, los ratones se transportaron desde el bioterio a la sala de procedimientos cubiertos por una bolsa negra. Una vez en la sala, se dejaron descubiertos dentro de la caja durante al menos 30 minutos para iniciar el período de aclimatación. El protocolo de la prueba se describe a continuación y se siguió según se ha descrito previamente (Carrell et al., 2016), con pequeñas variaciones:

Antes del experimento, se entrenó a los ratones a 24 rpm en una rueda giratoria ajustada, con una rueda de 3 cm de diámetro, y se midió la latencia de caída (máximo 60 s) durante 4 ensayos en 3 días consecutivos. Los primeros dos días se realizará un ensayo de 60 segundos a 24 rpm constante y se registraron las veces de caída del ratón. En el tercer día cada ratón se sometió a 2 pruebas a 5, 8, 15, 20, 24, 31, 33 y 37 rpm, y se registró la latencia promedio de caída para cada velocidad, con un descanso de 1h entre pruebas. Después de 3 días, los ratones se sometieron a un ensayo de fatiga en la rueda giratoria. La velocidad de rotación comenzó a 15 rpm durante 15 minutos, seguida de un aumento de la velocidad de 1 rpm cada 5 minutos hasta 21 rpm; luego se utilizó una velocidad máxima de 22

rpm durante los últimos 15 min del protocolo de 1 h. Cada caída fue registrada y el ratón fue devuelto a la rueda. Se determinó el número de caídas acumuladas durante toda la prueba.

Medición Presión Arterial en animales conscientes por método del manguito en la cola:

La presión arterial se mide en la cola del ratón utilizando sensor de registro de presión de volumen (VPR). Para la determinación de la presión arterial sistólica y diastólica se realiza llene con aire de cámara neumática que rodea la cola de animal sobre placa calefactora (32°C). El registro de la desaparición de onda de pulso (menor volumen de la cola), la aparición de oscilaciones de volumen y finalmente el aumento de volumen registrados al desinflar de forma progresiva en el manguito de presión, permite los registros. La presión arterial media se calcula a partir de los parámetros mencionados. El uso de conversor análogo digital y *software* de propósito particular permite análisis de datos en tiempo real. Para las mediciones,, los animales fueron sometidos a entrenamiento previo durante una semana. Una vez que se comprobó que los animales ingresaban espontáneamente al tubo de registro y no ocurrían artefactos de movimiento durante los ciclos inflado/desinflado, se iniciaron los registros del estudio. Los resultados de 10 mediciones consecutivas obtenidas en una sesión (20 minutos) se utilizaron para calcular los valores promedio, que son los que se informan como valores individuales para cada animal al finalizar el periodo de tratamiento (MP2 y control).

Cambios rápidos de presión arterial en respuesta a infusión de una dosis de MP2, fenilefrina y nifedipino por vía endovenosa:

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano al 1,5% y la temperatura corporal se mantuvo a 37°C utilizando una almohadilla térmica durante el procedimiento. Se procedió a insertar catéter (320 micrómetros diámetro externo, Silmag, Argentina) de poliuretano en la arteria carótida izquierda. La presión sanguínea se midió continuamente con un transductor de presión (MLT 380D, ADInstruments, Australia), conectado a catéter en la arteria carótida izquierda, utilizando conversor

análogo-digital y sistema PowerLab (ADInstruments PowerLab 4/30 ML866, Australia). Previo a su utilización se realizó calibración del sistema contra manómetro de mercurio. Se registraron los valores de presión basal 15 minutos después de terminado el procedimiento quirúrgico de instalación del catéter; los cambios de presión arterial media después de la inyección intravenosa de fenilefrina (PE) (0,1 mg/mL, 50 µL), MP2 (10 mg/mL, 2 mg/kg peso animal, 100 µL, disuelto en solución NaCl 09%/ 1% etanol P.A.)/vehículo y nifedipino (10mg/mL, 2mg/kg peso animal, 100 µL, disuelto en solución NaCl 09%/ 1% etanol P.A.). La inyección de los fármacos se realizó mediante punción del Seno Venoso Retroorbital. La primera parte del estudio en cada ratón consistió en la evaluación del potencial efecto sobre la presión arterial de MP2 y vehículo, seguido de la inyección de fenilefrina que actúa como agente vasopresor debido a su acción vasoconstrictora (agonista alfa1-adrenergico). Luego de 20 minutos, tiempo suficiente para metabolización de fenilefrina, se realizó inyección de nifedipino (DHP vasodilatadora por bloqueo de canales de calcio tipo L). De esta forma se puede comparar el efecto de MP2 sobre la presión arterial con una DHP de acción conocida hipotensora y vasodilatadora. El protocolo de suministro de sustancias fue: 1) Inyección de MP2 o Vehículo (2 mg/kg; 100uL) + 5 minutos; 2) Inyección Fenilefrina, y 20 minutos para metabolización de fenilefrina (Zeng et al., 2020); finalmente, 3) Nifedipino, y 5 minutos para asegurar la metabolización de la droga en el organismo.

qPCR en Tiempo real:

Luego de la disección muscular, los músculos fueron conservados inmediatamente en nitrógeno líquido y guardados a -80°C. A partir de esto, los músculos esqueléticos fueron lisados utilizando un mini homogeneizador BeadBug (CORE Life Sciences, USA). El RNA total fue extraído utilizando TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El cDNA fue obtenido por transcripción reversa a partir de 1 µg de RNA total, utilizando la enzima SuperScript II (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. Los ensayos de qPCR en tiempo real fueron realizados utilizando un termociclador (Stratagene Mx300P, Agilent) de acuerdo al siguiente protocolo: el mix de reacción estuvo dado por 10X, 0,5 µl sentido primer

(10 pmol/μl), 0,5 μl antisentido primer (10 pmol/μl), 4 μl EVA Green (Invitrogen) ,1 μl cDNA y 13 μl de H₂O sin nucleasas, para un volumen final de 20 μl. Los partidores utilizados fueron: TnlS: 5' GAGGTTGTGGGCTTGCTGTATGA-3' (sentido), 5' GGAGCGCATATTAGGGATGT-3' (antisentido); Tnlf: 5' AGGT GAAGGTGCAGAAGAGC-3' (sentido), 5' TTGCCCTCAGGTCAAATAG-3' (antisentido); *Myh7*: 5'-AGC CTT GTA TCG ACC TCA TCG AGA-3' (sentido), 5'-AAG TGA GCC TGG TAC TTG CGT T-3' (antisentido); *Myh1*: 5'-TTA GAG TCG TGG AGT CCA TGC AGA-3' (sentido), 5'-GGT TGG AGT GGT TCA GCT GGA TTT-3' (antisentido); *Myh2*: 5'-TGG CAG AGT GGA AGC AGA AGT ATG-3' (sentido), 5'-CTC GCT TCA GGG TTT CTA GCT GAT-3'; *18S* (sentido); *18s*: 5' TAT TGC TCA ATC TCG GGT GG 3' (antisentido), 5' AGT TGG TGG AGT GAC GAT TTG TC 3' (sentido); *P0*: 5' ATA GCC TTG CGC ATC ATG GT 3' (antisentido), 5' CTC CAA GCA GAT GCA GCA GA 3' (sentido). El gen *18S* y *P0* fueron utilizados como normalizadores para las reacciones de troponinas I lentas y rápidas, y cadenas pesadas de miosinas, respectivamente. Las condiciones de termociclado para los genes Troponinas I fueron las siguientes: 1 ciclo de 15 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de [15 s a 95°C] + [20 s a 60-65°C] + [20 s a 72°C]. Los valores de expresión fueron normalizados por el gen *18s* y reportados como veces de cambio ($2^{\Delta\Delta Ct}$). Para las MYH1, MYH2 y MYH7, las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo de 15 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de [15 s a 95°C] + [20 s a 60°C] + [20 s a 72°C], seguido de 1 ciclo de [1 min a 95°C] + [30 s a 55°C] + [30 s a 95°C]. Los valores de expresión fueron normalizados por el gen *P0* y reportados como veces de cambio ($2^{\Delta\Delta Ct}$). El valor de Ct fue determinado por el software MXPro cuando el nivel de fluorescencia fue un 25% mayor que la fluorescencia basal. Los productos de PCR fueron verificados por inspección visual de las curvas de melting.

Inmunofluorescencia:

Se realizaron criosecciones de tejido muscular de 12 μm de espesor a -20°C (Leica, GM 1510 S) de músculos: Sóleo, Tibial anterior, Gastrocnemio y Cuádriceps de un animal tratado con droga y uno tratado con solución salina. Con el fin de comparar el inmunomacaje (fluorescencia; MyHC I, MyHC IIa, MyHC IIb y MyHC IIx) de

secciones musculares provenientes de dos animales diferentes, las criosecciones fueron montados sobre el mismo portaobjetos. El área en que se encontraban los cortes en cada portaobjetos fue delimitada con un lápiz hidrófobo (DakoPen) para la incubación con soluciones de marcaje. Los cortes de tejido se fijaron con PFA 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente (gotas ~ 30 μ l). Luego de esto, se utilizó una solución de glicina 100 mM durante 10 min para detener el proceso de fijación, y se realizaron 6 lavados de 5 min c/u con buffer fosfato salino (PBS 1X). Se bloqueó el corte con BSA 4% + 0,1% tritón para permeabilizar el tejido durante 1.30 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, las fibras fueron incubadas con anticuerpos primarios, dilución 1:100 (AB/BSA) durante 18 horas, a 4°C en cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X y se incubó el anticuerpo primario en las concentraciones indicadas más abajo, por 1h en cámara húmeda (cubierta completamente con papel aluminio para prevenir la entrada de luz) a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron 3 veces durante 10 minutos. Finalmente, se incubó con DAPI durante 5 minutos y se volvió a lavar por 5 minutos 6 veces más. El proceso se completó montando los cortes con una gota de medio de montaje DAKO (Agilent, USA) y cubre objetos de vidrio, procurando no generar burbujas sobre el corte. La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal (Zeiss, LSM 5 Pascal).

Anticuerpos:

Los siguientes anticuerpos primarios monoclonales fueron adquiridos de la empresa Hybridoma Bank: MyHC IIa (2F7-C, 1:100); MyHC IIb (10F5-c, 1:100), MyHCIIx (GH1-C), MyHC I (BA-F8, 1:100). El anticuerpo secundario fue adquirido en Themofisher Scientific Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG (H+L), probándose diversas diluciones: 1:500; 1:800 y 1:1000.

Histoquímica Enzimática SDH:

Se prepararon criosecciones de 12 μ m de espesor de músculos esqueléticos de animales de los diferentes grupos experimentales, las que fueron conservados a -80°C hasta su uso. El día previo al ensayo de actividad enzimática las secciones de

tejido fueron transferidas a -20°C . Para determinación de la actividad enzimática SDH se incubaron los cortes con una solución tampón fosfato (40 mL de KH_2PO_4 0,2M; 160 mL de Na_2HPO_4 0,2M; 200 mg de nitroazul de tetrazolio y 10,8g de ácido succínico) durante 15 min a 37°C . Pasado el tiempo de incubación, los cortes se lavaron con agua corriente durante 10 segundos. Finalmente, el montaje se realizó con gelatina y cubreobjetos de vidrio, procurando no dejar burbujas sobre el corte y se dejaron a temperatura ambiente hasta que la gelatina se solidificara. Los portaobjetos con las secciones fueron observadas en un microscopio de luz transmitida (Zeiss, Axiolab 5), tomándose fotografías para análisis posterior (cámara: Leica DFC295; software: Leica Application Suite).

Análisis Estadístico:

Los resultados de las pruebas funcionales, qPCR, SDH y Presión Arterial, se expresaron como: promedio \pm SD en caso de presentar una distribución normal, o como mediana, en caso contrario. Antes de realizar el análisis estadístico de todos los resultados obtenidos, se aplicó un test de normalidad (Shapriko Wilk y D'Agostino & Pearson) a cada grupo. En base al resultado obtenido al test de normalidad, se aplicó la prueba de t-test en caso de distribución normal o Wilcoxon test para datos no distribuidos normalmente, para comparar los resultados del mismo grupo (MP2 o Salino) antes y después del tratamiento I.P. Las pruebas estadísticas utilizadas para comparar los grupos MP2 y Salino antes y después de I.P. fueron Mann Whitney test para datos que no presentaron distribución normal y Unpaired test (Welch correction) para datos con distribución normal pero SD variable. El tamaño de la muestra $n=24$ fue calculado bajo el criterio del 80% de potencia, tamaño del efecto de 0.6 y 3 grupos de estudio, con el software G.Power.

RESULTADOS

Rendimiento máximo en Prueba de Fuerza, Weight Test, de ratones adultos tratados crónicamente con MP2 o Solución Salina.

Inicialmente estudiamos el efecto del tratamiento con MP2 sobre el rendimiento en la prueba de fuerza *weight test* durante 4-6 semanas. Para evaluar si la prolongación del tratamiento con MP2 mejoraba los efectos sobre la capacidad de desarrollo de fuerza, estudiamos el efecto del tratamiento con MP2 durante 8-10 semanas. El grupo de animales tratado con MP2 se comparó con un grupo de animales control, que paralelamente recibió inyección de solución salina. La Figura 3A muestra el resultado de la prueba funcional *Weight Test* aplicada a ratones adultos del grupo MP2 y del grupo control (salino) que recibieron tratamiento durante 4-6 semanas, antes (sesiones 1-7) y durante la última etapa de tratamiento (sesiones 8-16). Los resultados se expresan como la fuerza máxima promedio normalizada como % de peso levantado en cada sesión en relación al peso corporal de cada animal. Ambos grupos muestran un aumento progresivo de la fuerza máxima desde la sesión inicial hasta la sesión final de medición, en ambos períodos (pre y post tratamiento), con una evolución similar en ambos periodos de estudio. La Figura 3B muestra el resultado de la prueba funcional *Weight Test* aplicada a ratones adultos del grupo MP2 y del grupo control (salino) que recibieron tratamiento durante 8-10 semanas, antes (sesiones 1-7) y durante la última etapa de tratamiento (sesiones 8-17). La evolución de la curva muestra un comportamiento similar entre los grupos MP2 y Salino durante todo el período de medición. Para ambos grupos, se observa un aumento progresivo de la carga, expresada en % de peso máximo levantado, que llega hasta una meseta (evaluada como 3 puntos consecutivos numéricamente similares). Sin embargo, la curva de aumento progresivo de la carga en los animales tratados entre 4 a 6 semanas antes y después del tratamiento tienen un punto inicial y final muy parecido en ambas curvas, comparado con los grupos tratados entre 8 a 10 semanas que partieron la curva post tratamiento en un % de peso máximo más cercano a la primera meseta (antes del tratamiento) y terminaron más arriba de la meseta pre tratamiento. En este sentido, se observa un tendencia más marcada del

grupo tratado entre 8 a 10 semanas, especialmente observado en el grupo MP2, de presentar mayores niveles de producción de fuerza hacia el final del tratamiento.

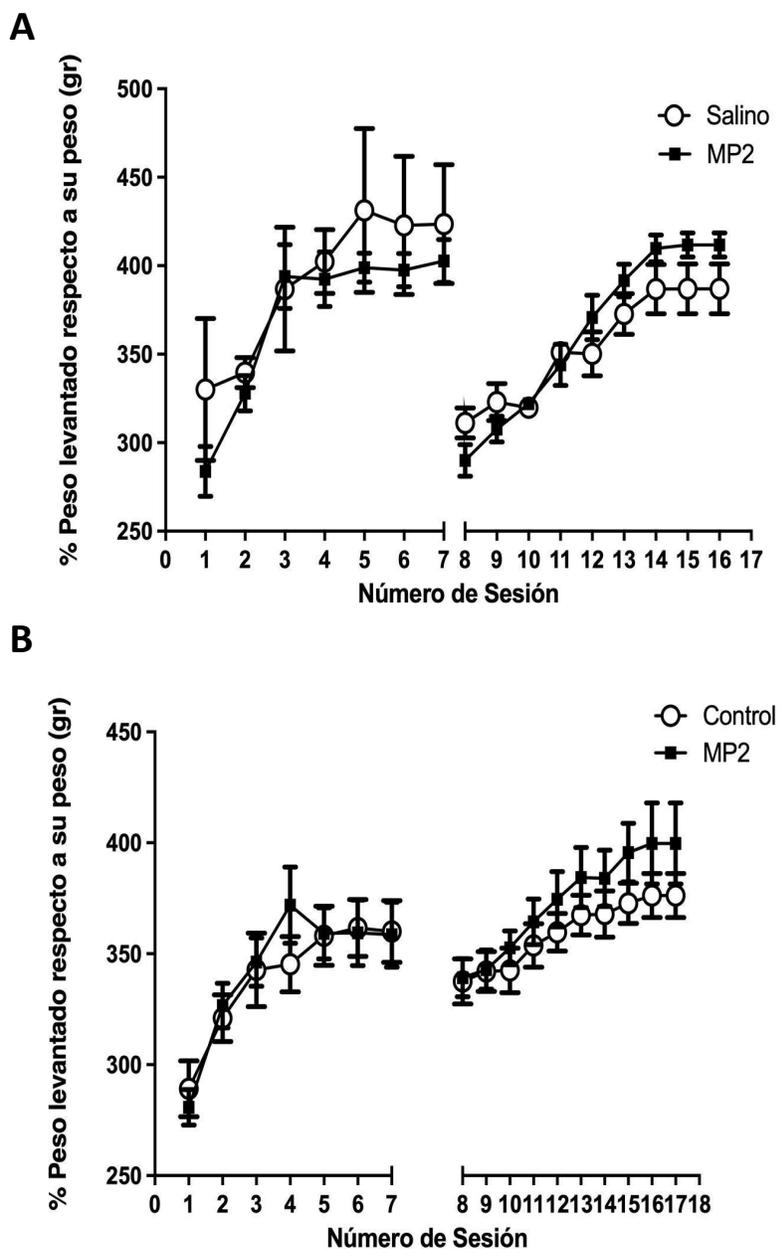


Figura 3. Efectos del suministro diario por 4 a 6 y 8 a 10 semanas de MP2 o Solución Salina en la Prueba Funcional *Weight Test*. A) Evolución del peso máximo promedio levantado (\pm SD) en sesiones *weight test*, por ratones del grupo salino (círculos blancos, control) y ratones del grupo MP2 (cuadrados negros), tratados durante 4 a 6 semanas. Para el cálculo de promedios, se utilizó el valor máximo registrado en cada sesión de

weight test. El peso levantado es expresado como porcentaje (%) del peso corporal, carga máxima levantada en la sesión (mg)/peso corporal (mg). Cada punto representa el promedio de 4 animales/sesión: 7 sesiones antes de iniciar la inyección I.P. (determinadas en 10 días) y 8 sesiones durante la inyección de MP2 o solución salina. B) Evolución del peso máximo promedio levantado (\pm SD) en sesiones *weight test*, por ratones del grupo salino (círculos blancos, control) y ratones del grupo MP2 (cuadrados negros), tratados durante 8 a 10 semanas.

La Figura 4A muestra la comparación del rendimiento en la prueba *weight test* del grupo MP2 antes y después del tratamiento durante 4 a 6 semanas (primer gráfico). En el grupo tratado entre 4 a 6 semanas, se observa que 3 de 4 ratones aumentaron su % de fuerza máxima y un ratón se mantuvo igual al % de peso máximo levantado inicial (leve disminución), pero la diferencia del grupo antes y después no es significativa. En el grupo tratado entre 8 a 10 semanas, se observó que 4 animales aumentaron su % de peso máximo levantado después del tratamiento MP2, y 3 animales se mantuvieron igual (leve disminución). La diferencia de % de peso máximo levantado para cada período de tratamiento no mostró diferencias significativas al comparar el período pre y post tratamiento. La figura 4B muestra el % de producción de fuerza máxima de cada ratón, correspondientes al promedio de los 3 puntos de la meseta, de los animales del grupo salino y MP2 antes y después del tratamiento. Se expresó y comparó la mediana de cada grupo y, observamos que la diferencia de % de peso máximo levantado entre el grupo Salino y MP2 tratados entre 4 a 6 y 8 a 10 semanas, no es significativo, aunque se observa una tendencia al alza en el grupo MP2 (que se evidencia más en el grupo tratado entre 8 a 10 semanas). Finalmente, en la Figura 4C se compararon los cambios de % de peso máximo levantado de cada animal del grupo Salino y MP2 tratados entre 4 a 6 y 8 a 10 semanas (primer y segundo gráfico, respectivamente). El cambio corresponde a la diferencia entre el valor de la meseta final e inicial de cada animal. Los resultados muestran que en el primer período de tratamiento (4 a 6 semanas), los ratones del grupo MP2 tuvieron una tendencia al alza (cambio $>$ 0) y el grupo salino tuvo 2 de 3 ratones que bajaron su % de peso (cambio $<$ 0). En cuanto al cambio del grupo tratado entre 8 a 10 semanas, el grupo MP2 tuvo 3 animales que mejoraron (cambio $>$ 0), 1 animal que se mantuvo igual y 2 animales que

disminuyeron su rendimiento en la prueba (cambio<0). En el grupo salino, 6 animales mejoraron respecto a su condición pre tratamiento (cambio>0) y 1 animal disminuyó su rendimiento (cambio<0). La diferencia de cambio entre el grupo Salino y MP2 en ambos períodos de tratamiento no mostró diferencias significativas.

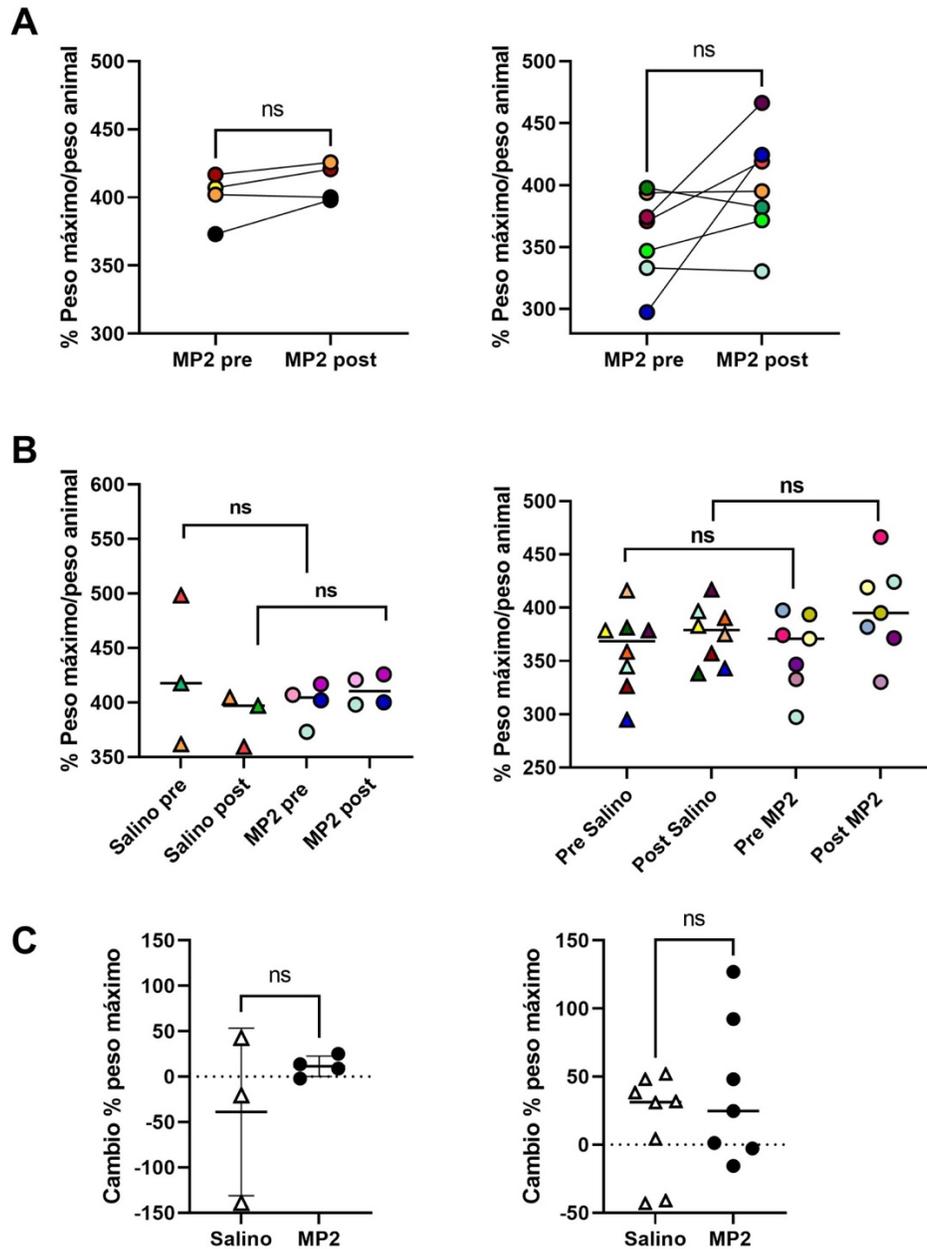


Figura 4. Efecto individual del suministro diario por 4 a 6 y 8 a 10 semanas de MP2 o Solución Salina en la Prueba Funcional *Weight Test*. A) Comparación del peso máximo levantado por cada animal antes y

después del tratamiento con MP2 (primer gráfico: tratamiento 4 a 6 semanas; segundo gráfico: tratamiento 8 a 10 semanas) en las últimas 3 sesiones de medición (% peso levantado respecto al peso individual de cada animal), expresado como el promedio de la meseta. B) Comparación del peso máximo levantado por cada animal entre el grupo Salino y MP2, antes y después del tratamiento (primer gráfico: tratamiento 4 a 6 semanas; segundo gráfico: tratamiento 8 a 10 semanas) en las últimas 3 sesiones de medición (% peso levantado respecto al peso individual de cada animal), expresado como el promedio de la meseta. C) Comparación del cambio (expresado como la mediana de la meseta antes del tratamiento-meseta después del tratamiento de cada animal) del % de peso máximo levantado por cada animal entre los grupos Salino y MP2 tratados entre 4 a 6 semanas (primer gráfico) y 8 a 10 semanas (segundo gráfico).

Rendimiento máximo en Prueba de Resistencia cardiorrespiratoria, RotaRod 1h, de ratones adultos tratados crónicamente con droga MP2 o Solución Salina.

En un segundo set de experimentos, evaluamos la resistencia cardiorrespiratoria en el grupo MP2 y en ratones del grupo Salino mediante la prueba Rotarod 1h. Se estudió un tratamiento de duración de 4-6 semanas y otro tratamiento de duración de 8-10 semanas. El rendimiento en la prueba fue expresado como el número total de caídas de los grupos tratados con droga y solución salina entre 4 a 6 semanas y 8 a 10 semanas, se muestran en la Figura 5 y 6. En la figura 5A y 5B se muestra la evolución temporal del número total de caídas antes del tratamiento y después del tratamiento del grupo tratado con MP2 y solución salina durante 4 a 6 y 8 a 10 semanas. En ambos períodos de tratamiento, se observa que el grupo tratado con MP2 mantuvo un mayor número de caídas antes y después del tratamiento comparado con el grupo Salino, aunque ambas curvas muestran un leve descenso en el total de caídas posterior al tratamiento. de caídas mayor comparado al grupo Salino, que aumentó hacia el final de tratamiento. Se observa que el comportamiento de la curvas varía en cada período de tratamiento, siendo la curva del segundo período parecida entre el grupo Salino y MP2 y, presentando mayor diferencia entre ambos grupos durante el primer período de tratamiento.

En la Figura 6A se muestra el número de caídas, expresada como un promedio de los últimos 3 puntos de la meseta, del grupo Salino y MP2 pertenecientes al período de tratamiento de 4 a 6 semanas (primer gráfico) y 8 a 10 semanas (segundo

gráfico). Se observó que de los animales pertenecientes el primer período de tratamiento, 2 de ellos mejoraron su rendimiento (disminuyeron n° de caídas) y 2 se mantuvieron iguales (leve aumento). En cuanto a los animales del segundo período de tratamiento, 3 animales mejoraron su rendimiento (menor n° de caídas) y 5 animales aumentaron el n° de caídas. A pesar de la tendencia de los animales del grupo MP2 a disminuir el rendimiento en esta prueba, expresado como un aumento en el n° de caídas posterior a ambos períodos de tratamiento, la diferencia entre ambos períodos no es significativa. Finalmente, en la Figura 6C. se observa la comparación del cambio en el n° de caídas, que representa la diferencia entre el promedio de los últimos tres puntos de medición que corresponden a la meseta final y la meseta inicial respectivamente, de los grupos Salino y MP2 en ambos períodos de tratamiento. Los resultados muestran que para el primer período de tratamiento, el grupo Salino tiene 3 ratones con menor n° de caídas posterior al tratamiento (cambio<0) y el grupo MP2 tiene 3 animales con aumento en n° de caídas posterior al tratamiento (cambio>0), con 1 sólo que presentó baja en n° de caídas. Por otro lado, para el segundo período de tratamiento, el grupo salino tuvo 4 animales con aumento en n° de caídas y 4 con baja, mientras que el grupo MP2 tuvo 5 animales con aumento en n° de caídas y 2 con baja. A pesar de estas diferencias, el n° de caídas entre ambos grupos para cada período no es significativa.

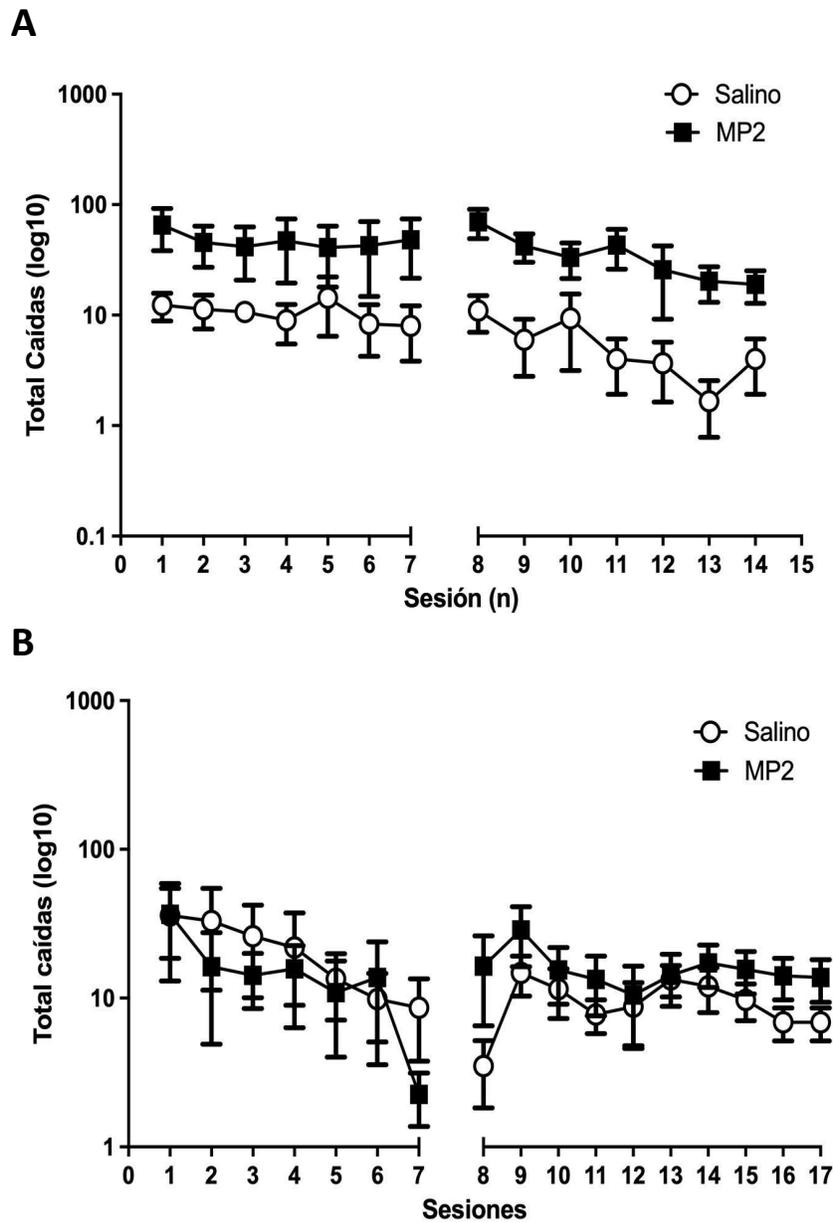


Figura 5. Efectos del suministro diario por 4 a 6 y 8 a 10 semanas de MP2 o Solución Salina en la Prueba Funcional *Rotarod 1h*. A) Evolución del n° de caídas (\pm SD) en sesiones *rotarod 1h*, por ratones del grupo salino (círculos blancos, control) y ratones del grupo MP2 (cuadrados negros), tratados durante 4 a 6 semanas. Para el cálculo de promedios, se utilizó el valor total de caídas registradas en 1 h en cada sesión de *rotarod*. Cada punto representa el promedio de 4 animales/sesión: 7 sesiones antes de iniciar la inyección I.P. (determinadas en 10 días) y 8 sesiones durante la inyección de MP2 o solución salina. B) Evolución del n° de caídas (\pm SD) en sesiones *rotarod 1h*, por ratones del grupo salino (círculos blancos, control) y ratones del grupo MP2 (cuadrados negros), tratados durante 8 a 10 semanas. Para el cálculo de promedios, se utilizó el valor total de caídas registradas en 1 h en cada sesión de *rotarod*. Cada punto representa el promedio de 8 animales/sesión: 7 sesiones antes de iniciar la inyección I.P. (determinadas en 10 días) y 7 sesiones durante la inyección de MP2 o solución salina

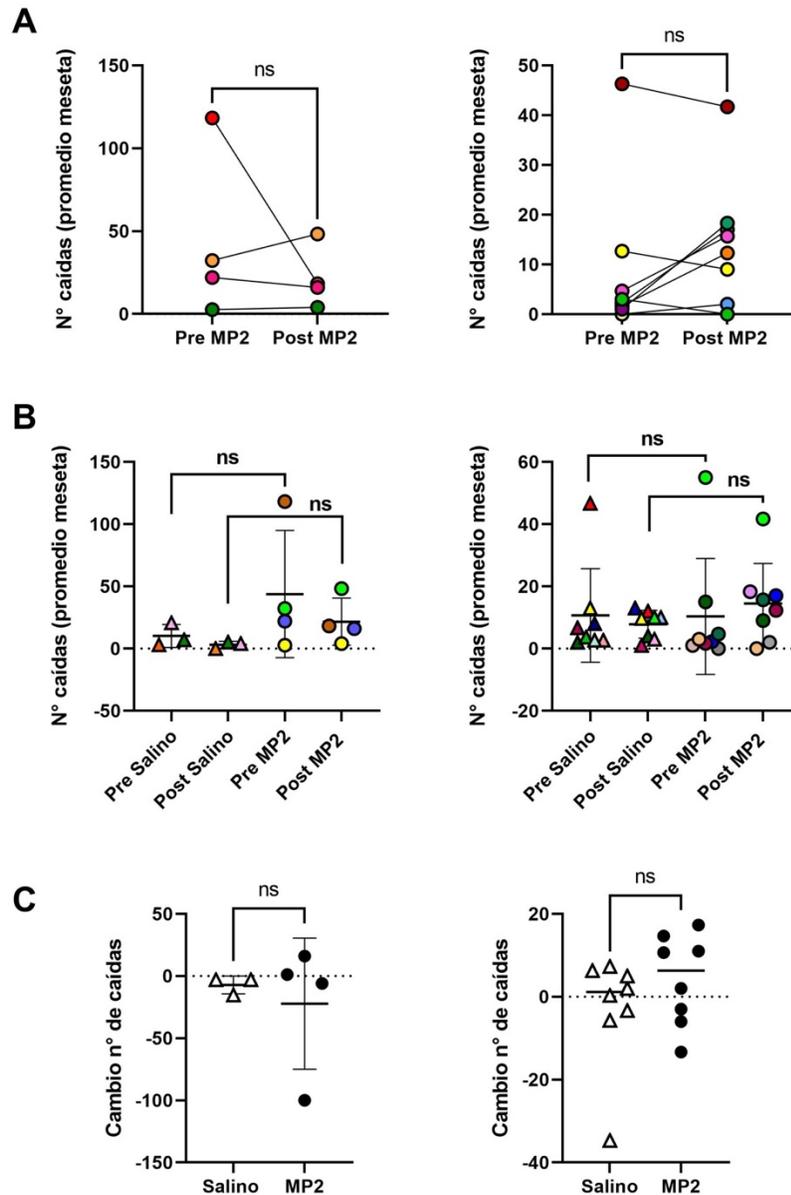


Figura 6. Efecto individual del suministro diario por 4 a 6 y 8 a 10 semanas de MP2 o Solución Salina en la Prueba Funcional Rotarod 1h. A) Comparación del n° total de caídas en 1 h por cada animal antes y después del tratamiento con MP2 (primer gráfico: tratamiento 4 a 6 semanas; segundo gráfico: tratamiento 8 a 10 semanas) en las últimas 3 sesiones de medición, expresado como el promedio de la meseta. B) Comparación del n° de caídas total en 1 h por cada animal entre el grupo Salino y MP2, antes y después del tratamiento (primer gráfico: tratamiento 4 a 6 semanas; segundo gráfico: tratamiento 8 a 10 semanas) en las últimas 3 sesiones de medición, expresado como el promedio de la meseta. C) Comparación del cambio (expresado como la mediana de la meseta antes del tratamiento-meseta después del tratamiento de cada animal) del n° total de

caídas en 1h por cada animal entre los grupos Salino y MP2 tratados entre 4 a 6 semanas (primer gráfico) y 8 a 10 semanas (segundo gráfico).

Rendimiento máximo en prueba de Coordinación Neuromuscular, RPM progresivos, de ratones adultos tratados crónicamente con droga MP2 o Solución Salina.

El rendimiento en la prueba funcional de *RPM* progresivas, expresada en número total de caídas de los grupos tratados con droga y solución salina entre 4 a 6 semanas y 8 a 10 semanas, se muestran en la Figura 7. En la Figura 7A y 7B se muestra la evolución temporal del número total de caídas en la prueba de *RPM* progresivos de los grupos MP2 y Salinos antes y después de la inyección I.P., tratados entre 4 a 6 y 8 a 10 semanas. Se observa que el grupo MP2 presentó mayor n° de caídas que el grupo Salino, antes y después del tratamiento entre 4 a 6 semanas. A diferencia de esto, el grupo MP2 y Salino antes del tratamiento entre 8 a 10 semanas, presentó diferencias en el n° de caídas, siendo mayor para el grupo MP2, posterior al tratamiento.

En la Figura 8A, se compara el n° de caídas de los animales tratados con MP2 antes y después del tratamiento durante 4 a 6 (primero gráfico) y 8 a 10 semanas (segundo gráfico). Se observa que para el primer período de tratamiento, 2 animales aumentaron su n° de caídas posterior al tratamiento con MP2, mientras que 1 se mantuvo igual y 1 disminuyó. En el segundo período de tratamiento, 2 animales disminuyeron su n° de caídas y 6 animales lo aumentaron. A pesar de estas diferencias, la comparación entre el n° de caídas antes y después del tratamiento con MP2 en ambos períodos, no es significativa. En la Figura 8B se muestra la comparación del n° de caídas, correspondiente al promedio de los 3 últimos puntos de la meseta de cada animal, de los grupos Salinos y MP2 antes y después de cada tratamiento. Se observa que, el grupo MP2 de los dos períodos de tratamiento, aumenta su n° de caídas (mediana grupo MP2 < mediana grupo Salino) y que, la diferencia es mayor entre los grupos tratados 8 a 10 semanas. El análisis estadístico de estas diferencias no es significativo. En la Figura 8C se compara el cambio en el n° de caídas de los grupos Salino y MP2 tratados 4 a 6 y 8 a 10 semanas. Se

observa que del grupo Salino (4 a 6 semanas), 1 animal no cambió su rendimiento, 1 animal mejoró y 1 animal disminuyó su rendimiento. En el grupo MP2 (4 a 6 semanas), 3 animales aumentaron el n° de caídas (cambio>0) y 1 animal disminuyó. En cuanto al grupo Salino (8 a 10 semanas), 5 animales mejoraron (cambio<0), 1 se mantuvo igual y 2 animales disminuyeron el rendimiento (cambio>0). También, el grupo MP2 (8 a 10 semanas) tuvo 4 animales que aumentaron el n° de caídas, 2 animales que se mantuvieron igual y 2 animales que disminuyeron el n° de caídas. La comparación del n° de caídas de los grupos Salino y MP2 en ambos períodos de tiempo, mostró no ser significativa.

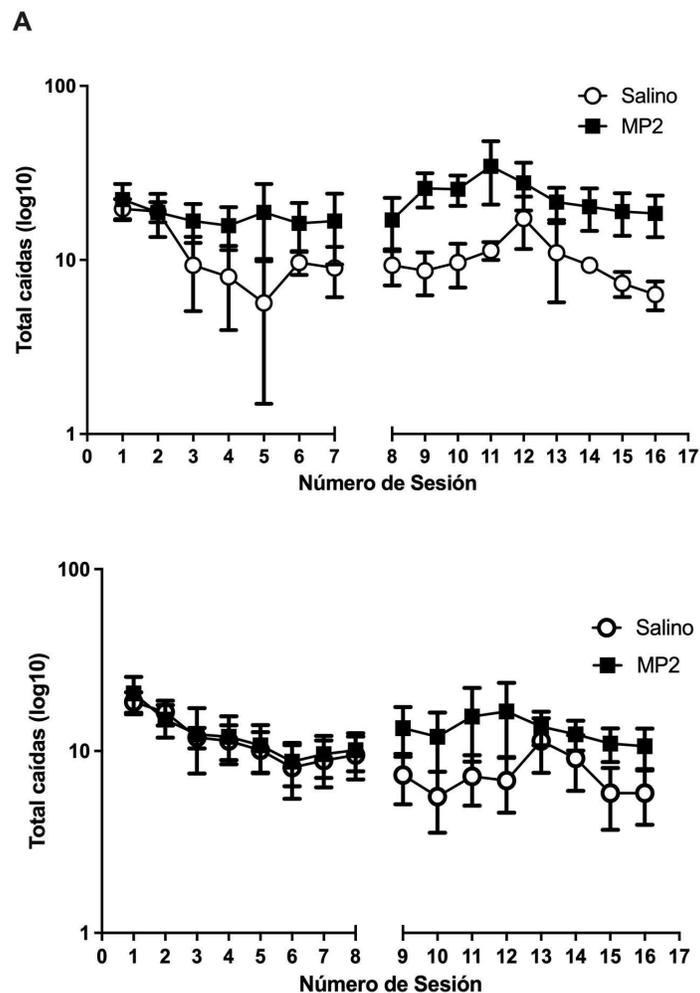


Figura 7. Efectos del suministro diario por 4 a 6 semanas de MP2 o Solución Salina en la Prueba Funcional RPM progresivos . A) Evolución del total de caídas promedio (\pm SD) en sesiones *rpm progresivos*, por ratones del grupo salino (círculos blancos, control) y ratones del grupo MP2 (cuadrados negros). Para el cálculo de promedios, se utilizó el valor final registrado en cada sesión de *rpm progresivos*. El total de caídas es expresado como las veces que el ratón se cayó de la rueda registrado a distintos rpm (incrementales de 8 a 37 rpm) durante 1 minuto cada uno (8 minutos en total). Cada punto representa el promedio de 4 animales/sesión: 7 sesiones antes de iniciar la inyección I.P. (determinadas en 10 días) y 9 sesiones durante la inyección de MP2 o solución salina (las sesiones se iniciaron 3 semanas después de comenzar las inyecciones I.P.). B) Evolución del total de caídas promedio (\pm SD) en sesiones *rpm progresivos*, por ratones del grupo salino y ratones del grupo MP2. Cada punto representa el promedio de 8 animales/sesión: 8 sesiones antes de iniciar la inyección I.P. (determinadas en 10 días) y 8 sesiones durante la inyección de MP2 o solución salina (las sesiones se iniciaron 7-9 semanas después de comenzar las inyecciones I.P.).

Niveles de Expresión de mRNA de Troponina Inhibitoria Lenta (Tnls), Troponina Inhibitoria Rápida (Tnlf) y Enzima glucolítica Enolasa de ratones tratados con MP2 y Solución Salina después de tratamiento I.P. durante 4 a 6 y 8 a 10 semanas.

Para evaluar los potenciales cambios del fenotipo muscular causado por el tratamiento crónico con MP2, estudiamos la abundancia relativa de los transcritos de los genes *Tnls* (fibra lenta), *Tnlf* y *Eno3* (fibra rápida) en músculos esqueléticos adultos (Sóleo, Gastrocnemio, Cuádriceps y Tibial Anterior) de las extremidades inferiores de ratón (Figura 9, 10 y 11, respectivamente). En la Figura 9A se muestra el resultado del análisis del gen *Tnls* de cada grupo muscular de animales tratados con MP2 y solución Salina después de 4 a 6 semanas de tratamiento. Se observó que para los grupos tratado entre 4 a 6 semanas con MP2 o Salino, no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión de mRNA del gen de Troponina Inhibitoria Lenta en ninguno de los grupos musculares estudiados. Los niveles de expresión del gen *Tnls* en cada grupo muscular después de 4 a 6 semanas de tratamiento I.P. , evaluados como veces de cambio, en el grupo Salino fueron: SOL: 0,4-1,2 veces; GAS: 0,2-1,8 veces; CUA: 0,5-3,8 veces; TA: 0,8-1,5 veces. Los niveles de expresión del gen *Tnls* en cada grupo muscular , evaluados como veces de cambio, en el grupo MP2: SOL: 0,25-1 veces; GAS: 0,6-2,5 veces; CUA: 0-3 veces; TA: 0-2 veces.

En la Figura 9B se muestran los resultados del análisis del gen *Tnls* de cada grupo muscular de animales tratados con MP2 y solución Salina después de 8 a 10 semanas de tratamiento. Los resultados muestran que al final del período de tratamiento durante 8 a 10 semanas, no hubo diferencias significativas en la expresión del gen *Tnls* entre los grupos Salino y MP2 en ninguno de los músculos evaluados. Los niveles de expresión del gen *Tnls* después de 8 a 10 semanas de tratamiento en cada grupo muscular , evaluados como veces de cambio, en el grupo

Salino fueron: SOL: 0-5 veces; GAS: 0-4 veces; CUA: 0-4 veces; TA: 0,5-1 veces. Los niveles de expresión del gen *Tnls* en cada grupo muscular, evaluados como veces de cambio, en el grupo MP2: SOL: 0-42 veces; GAS: 0-11 veces; CUA: 0-4 veces; TA: 0-3 veces.

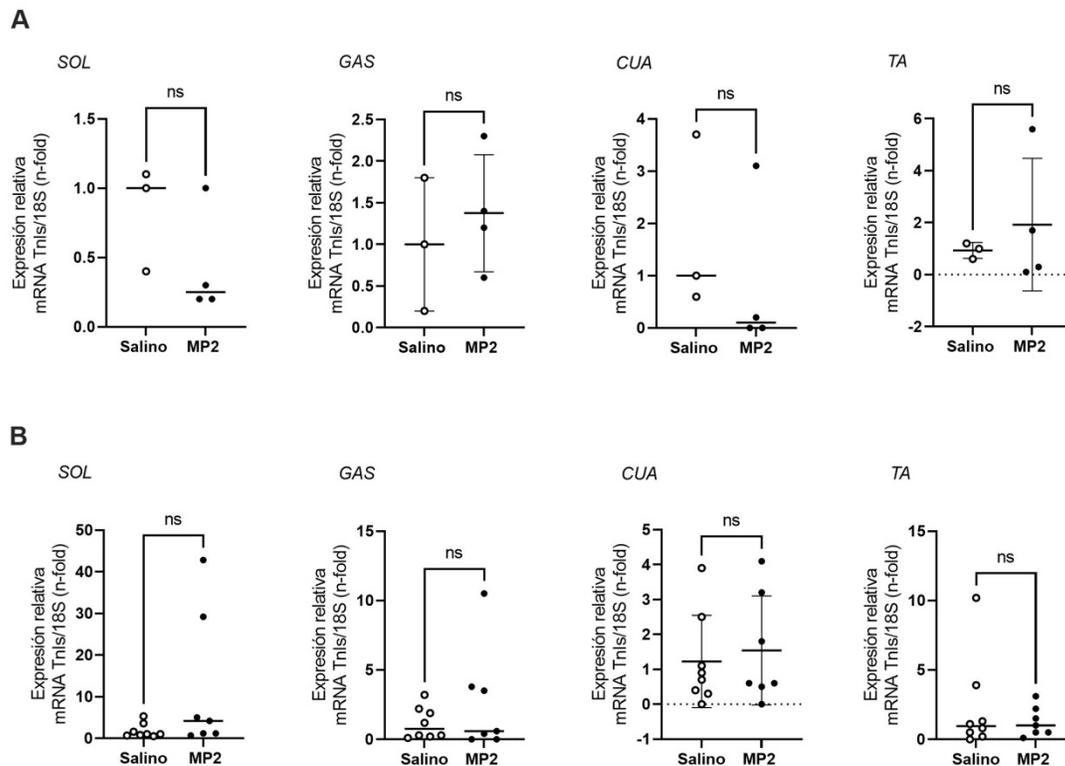


Figura 9. Efectos del suministro crónico de MP2 o Solución Salina sobre la abundancia relativa de los transcritos de Troponina Inhibitoria Lenta (*Tnls*) evaluado por RT qPCR. A) Comparación de los valores de la expresión relativa de mRNA de *Tnls* después del tratamiento I.P. durante 4 a 6 semanas con MP2 y Solución salina de los músculos Sóleo=SOL, Gastrocnemio=GAS, Cuádriceps=CUA y Tibial Anterior=TA. Cada punto representa el promedio (\pm SD) o mediana de 4 animales en el grupo MP2 y 3 animales en grupo control, al término del tratamiento I.P. B) Comparación de los valores promedios (\pm SD) o mediana de la expresión relativa de mRNA de *Tnls* después del tratamiento I.P. durante 8 a 10 semanas con MP2 y Solución salina de los músculos Sóleo=SOL, Gastrocnemio=GAS, Cuádriceps=CUA y Tibial Anterior=TA.

En la Figura 10A se muestra el resultado del análisis del gen *Tnlf* de cada grupo muscular de animales tratados con MP2 y solución Salina después de 4 a 6

semanas de tratamiento. Los resultados muestran que los animales tratados durante 4 a 6 semanas con MP2 o Salino, no tuvieron diferencias significativas en la expresión del gen *Tnlf* en ninguno de los músculos evaluados. Los niveles de expresión del gen *Tnlf* del grupo Salino de cada músculo, evaluados como veces de cambio, fueron: SOL: 0,8-2,3 veces; GAS: 1 vez; CUA: 0,1-13 veces; TA: 0,8-1,1 veces. Los niveles de expresión del gen *Tnlf* del grupo MP2 de cada músculo, evaluados como veces de cambio, fueron: SOL: 0,3-0,5 veces; GAS: 0,5-0,8 veces; CUA: 0,1-3,5 veces; TA: 0,1-2,3 veces. La Figura 10B muestra el resultado del análisis del gen *Tnlf* de cada grupo muscular de animales tratados con MP2 y solución Salino después de 8 a 10 semanas de tratamiento. Se observó que, de todos los músculos estudiados, el músculo Sóleo del grupo MP2 presentó un aumento significativo del gen *Tnlf* comparado con el mismo músculo del grupo Salino ($p=0.0315$). Los otros músculos no presentaron diferencias significativas entre el grupo MP2 y Salino. Los niveles de expresión del gen *Tnlf* del grupo Salino de cada músculo, evaluados como veces de cambio, fueron: SOL: 0,1-5 veces; GAS: 0-2,2 veces; CUA: 0,5-1,8 veces; TA: 0-8 veces. Los niveles de expresión del gen *Tnlf* del grupo MP2 de cada músculo, evaluados como veces de cambio, fueron: SOL: 0,1-8,2 veces; GAS: 0,2-8,1 veces; CUA: 0,1-2,5 veces; TA: 0-4,5 veces.

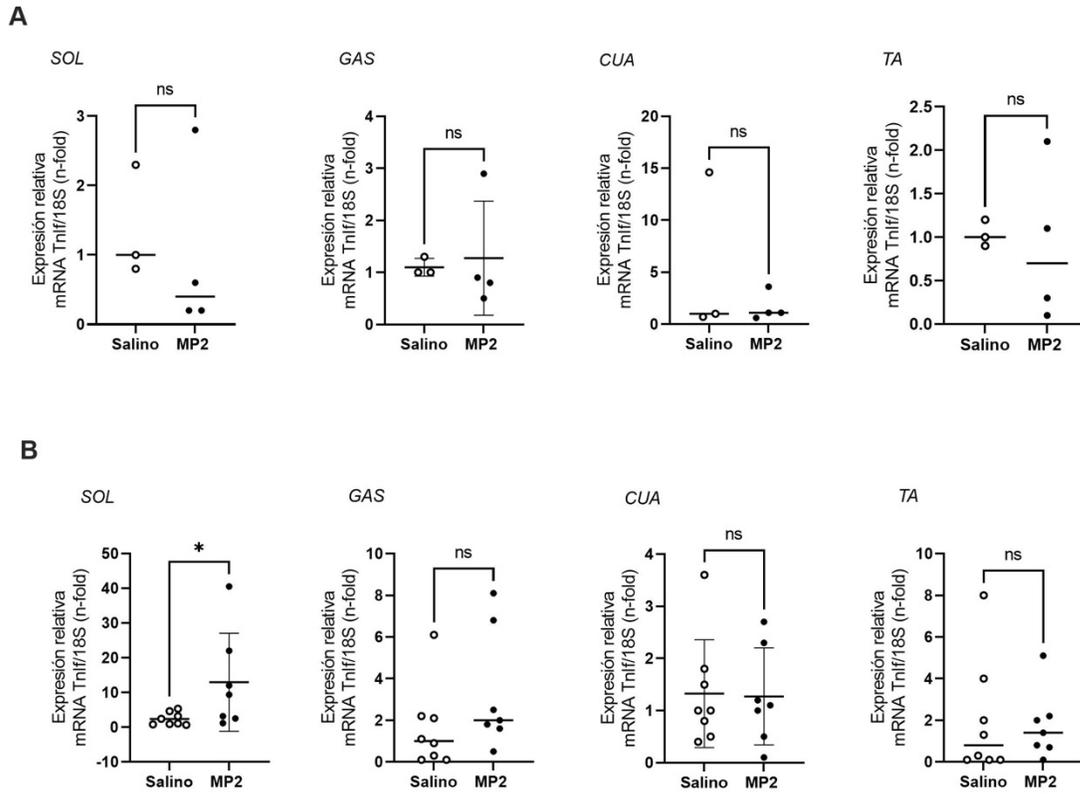


Figura 10. Efectos del suministro crónico de MP2 o Solución Salina sobre la abundancia relativa de los transcritos de Troponina Inhibitoria Rápida (*Tnif*) evaluado por RT qPCR. A) Comparación de los valores de la expresión relativa de mRNA de *Tnif* después del tratamiento I.P. durante 4 a 6 semanas con MP2 y Solución salina de los músculos SOL, GAS, CUA y TA. Cada punto representa el promedio (\pm SD) o mediana de 4 animales en el grupo MP2 y 3 animales en grupo control, al término del tratamiento I.P. B) Comparación de los valores promedios (\pm SD) o mediana de la expresión relativa de mRNA de *Tnif* después del tratamiento I.P. durante 8 a 10 semanas con MP2 y Solución salina de los músculos; * $p=0.0315$, promedio (\pm SD) del músculo SOL del grupo Salino vs. promedio (\pm SD) del músculo SOL del grupo MP2.

La Figura 11A muestra los resultados de la abundancia relativa de los transcritos del gen *Eno3* de los grupos tratados con MP2 y solución Salina durante 4 a 6 (Figura 11A) y 8 a 10 semanas (Figura 11B). Se observó que no hubo diferencias significativas en la expresión de mRNA del gen *Eno3* entre los grupos MP2 y Salino, en todos los músculos estudiados, después de 4 a 6 semanas de tratamiento. Los niveles de expresión del gen *Eno3* de cada músculo estudiado pertenecientes al

grupo Salino tratado entre 4 a 6 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: *SOL*: 1-2 veces; *GAS*: 1-1,2 veces; *CUA*: 0,2-16 veces; *TA*: 4-6 veces. Los niveles de expresión del gen *Eno3* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo MP2 tratado entre 4 a 6 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: *SOL*: 0,2-3,5 veces; *GAS*: 0,8-3,5 veces; *CUA*: 0,1-4,8 veces; *TA*: 0,8-3 veces. La Figura 11B muestra los niveles de expresión de mRNA del gen *Eno3*, de los grupos musculares estudiados pertenecientes al grupo MP2 y Salino tratados durante 8 a 10 semanas con tratamiento. Los resultados no muestran diferencias significativas entre ambos grupos, en todos los músculos estudiados. Los niveles de expresión del gen *Eno3* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo Salino tratado entre 8 a 10 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: *SOL*: 1-2 veces; *GAS*: 0-4,9 veces; *CUA*: 0,5-5,2 veces; *TA*: 0,1-15,8 veces. Los niveles de expresión del gen *Eno3* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo MP2 tratado entre 8 a 10 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: *SOL*: 0,4-41,1 veces; *GAS*: 0,4-14,6 veces; *CUA*: 0,1-2,7 veces; *TA*: 0-8,7 veces.

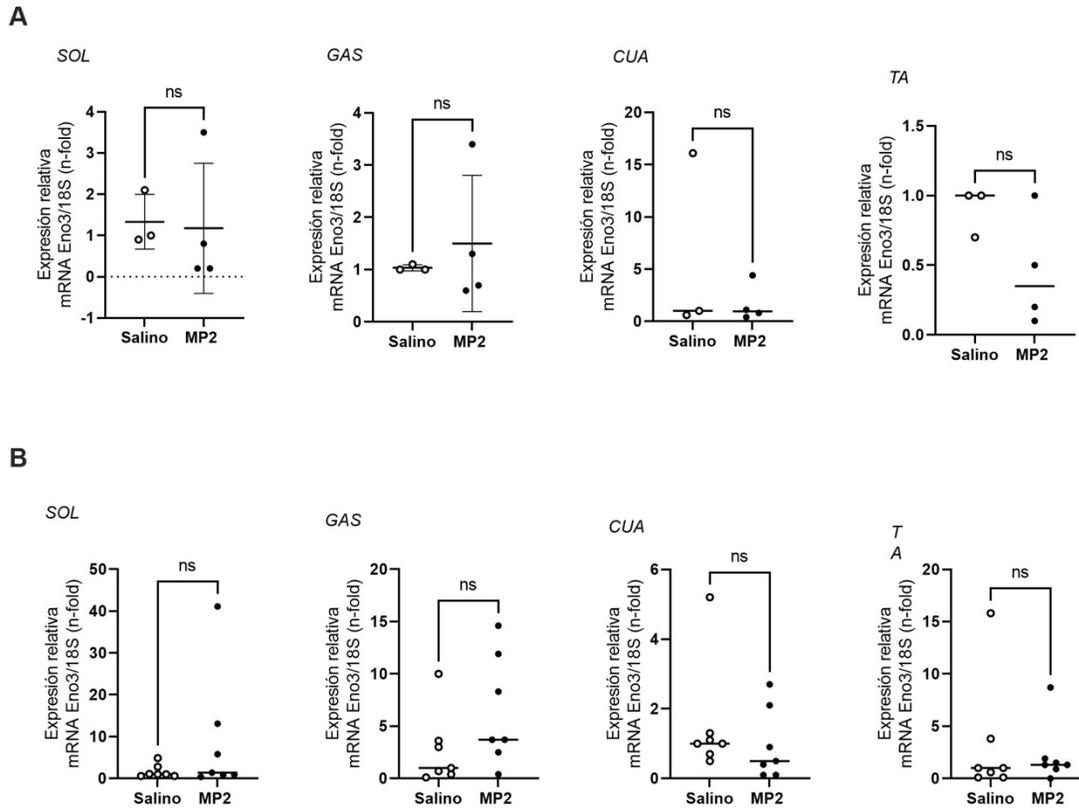


Figura 11. Efectos del suministro crónico de MP2 o Solución Salina sobre la abundancia relativa de los transcritos de Enolasa (*Eno3*) evaluado por RT qPCR. A) Comparación de los valores de la expresión relativa de mRNA de *Eno3* después del tratamiento I.P. durante 4 a 6 semanas con MP2 y Solución salina de los distintos músculos estudiados. Cada punto representa el promedio (\pm SD) o mediana de 4 animales en el grupo MP2 y 3 animales en grupo control, al término del tratamiento I.P. B) Comparación de los valores promedios (\pm SD) o mediana de la expresión relativa de mRNA de *Eno3* después del tratamiento I.P. durante 8 a 10 semanas con MP2 y Solución salina.

Niveles de expresión de mRNA de Cadenas Pesadas de Miosina tipo 1, 2a y 2x (Myh7b, Myh1, Myh2) de ratones tratados con MP2 y Solución Salina después de tratamiento I.P. entre 4 a 6 y 8 a 10 semanas.

Como segunda aproximación para el estudio del potencial efecto del tratamiento crónico con MP2 sobre el fenotipo muscular, medimos la abundancia relativa de los transcritos de los genes de las Cadenas Pesadas de Miosina (*Myh7b, Myh2, Myh1*) en músculos esqueléticos adultos (Sóleo, Gastrocnemio, Cuádriceps y Tibial

Anterior) de las extremidades inferiores de ratón se muestran en la Figura 12,13 y 14, respectivamente. En la Figura 12 se muestran los niveles de expresión de mRNA del gen *Myh7b*, correspondiente a la cadena pesada de miosina lenta tipo 1 (MyHC 1) de los músculos Sóleo, Gastrocnemio, Cuádriceps y Tibial Anterior, tratados durante 4 a 6 semanas (Fig. 12A) y 8 a 10 semanas (Fig. 12B). Los resultados muestran que posterior al tratamiento entre 4 a 6 y 8 a 10 semanas, la comparación entre los músculos estudiados del grupo MP2 y Salino no tuvieron diferencias significativas en la expresión del gen *Myh7b*. Los niveles de expresión del gen *Myh7b* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo Salino tratado entre 4 a 6 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: SOL: 0,6-9,6 veces; GAS: 0,8-13,2 veces; CUA: 0-2 veces; TA: 0,5-3,1 veces. Los niveles de expresión del gen *Myh7b* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo MP2 tratado entre 4 a 6 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: SOL: 3,9-198,1 veces; GAS: 0,2-1,1 veces; CUA: 0,1-2,1 veces; TA: 1,3-4,5 veces. Los niveles de expresión del gen *Myh7b* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo Salino tratado entre 8 a 10 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: SOL: 0,1-32,9 veces; GAS: 0,1-3,2 veces; CUA: 0,4-2,1 veces; TA: 0,1-2,4 veces. Los niveles de expresión del gen *Myh7b* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo MP2 tratado entre 8 a 10 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: SOL: 0,2-4,2 veces; GAS: 0,1-2,1 veces; CUA: 0,1-5 veces; TA: 0,2-1,4 veces.

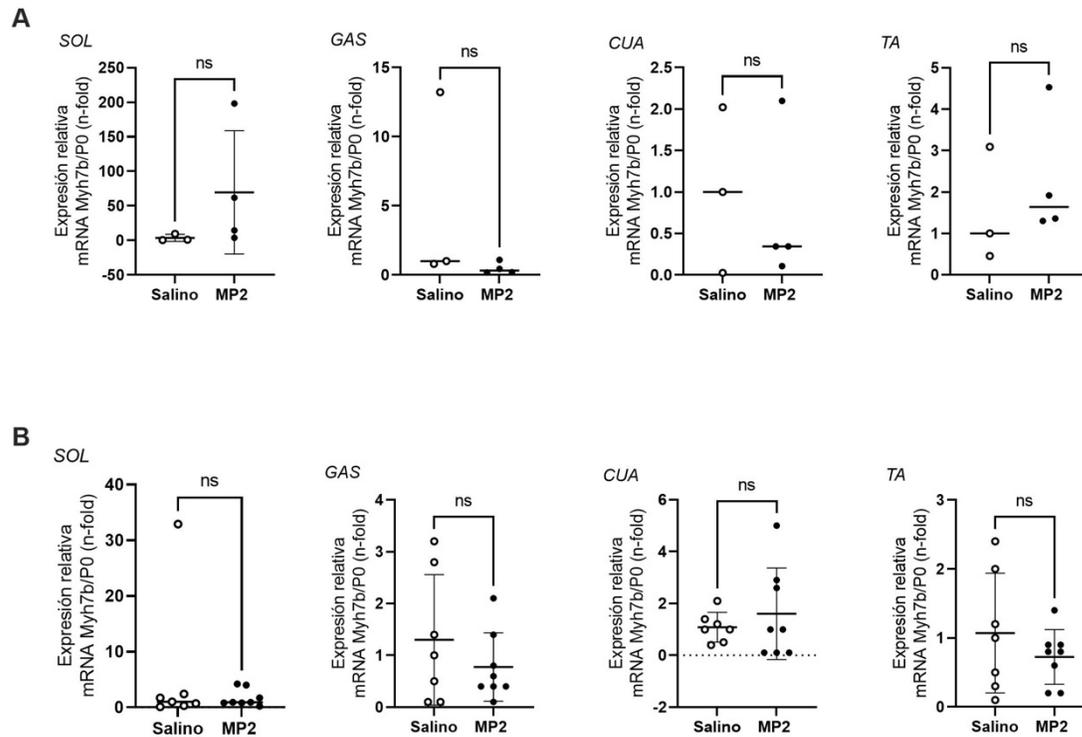


Figura 12. Efectos del suministro crónico de MP2 o Solución Salina sobre la abundancia relativa de los transcritos de Cadena Pesada de Miosina tipo I (*Myh7b*) evaluado por RT qPCR. A) Comparación de los valores de la expresión relativa de mRNA de *Myh7b* después del tratamiento I.P. durante 4 a 6 semanas con MP2 y Solución salina de los músculos SOL, GAS, CUA y TA. Cada punto representa el promedio (\pm SD) o mediana de 4 animales en el grupo MP2 y 3 animales en grupo control, al término del tratamiento I.P. B) Comparación de los valores promedios (\pm SD) o mediana de la expresión relativa de mRNA de *Myh7b* después del tratamiento I.P. durante 8 a 10 semanas con MP2 y Solución salina de los músculos SOL, GAS, CUA y TA.

Las Figuras 13A y 13B muestran los resultados del análisis de la expresión de mRNA del gen *Myh2*, evaluado por RT-qPCR de los músculos Sóleo, Gastrocnemio, Cuádriceps y Tibial Anterior de las extremidades inferiores de ratones adultos tratados con MP2 o solución Salina durante 4 a 6 y 8 a 10 semanas con inyección I.P. Los resultados muestran que los grupos MP2 y Salino no presentaron diferencias significativas en la expresión del gen *Myh2* en ninguno de los músculos estudiados, excepto en el músculo GAS, donde el grupo Salino presentó niveles significativos de la expresión del gen comparado con el grupo MP2, tratados durante 8 a 10 semanas. Los niveles de expresión del gen *Myh2* de cada músculo estudiado

pertencientes al grupo Salino tratado entre 4 a 6 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: *SOL*: 0,8-1,9 veces; *GAS*: 0,9-5,6 veces; *CUA*: 0,7-1,3 veces; *TA*: 0,9-2,7 veces. Los niveles de expresión del gen *Myh2* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo MP2 tratado entre 4 a 6 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: *SOL*: 0,3-3,9 veces; *GAS*: 0,3-1,1 veces; *CUA*: 0,1-1,1 veces; *TA*: 1,4-2,7 veces. Los niveles de expresión del gen *Myh2* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo Salino tratado entre 8 a 10 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: *SOL*: 0-2,1 veces; *GAS*: 0-1,3 veces; *CUA*: 0,1-4,2 veces; *TA*: 0-1,2 veces. Los niveles de expresión del gen *Myh2* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo MP2 tratado entre 8 a 10 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: *SOL*: 0-2,3 veces; *GAS*: 0-0,5 veces; *CUA*: 0-2,5 veces; *TA*: 0,1-1,4 veces.

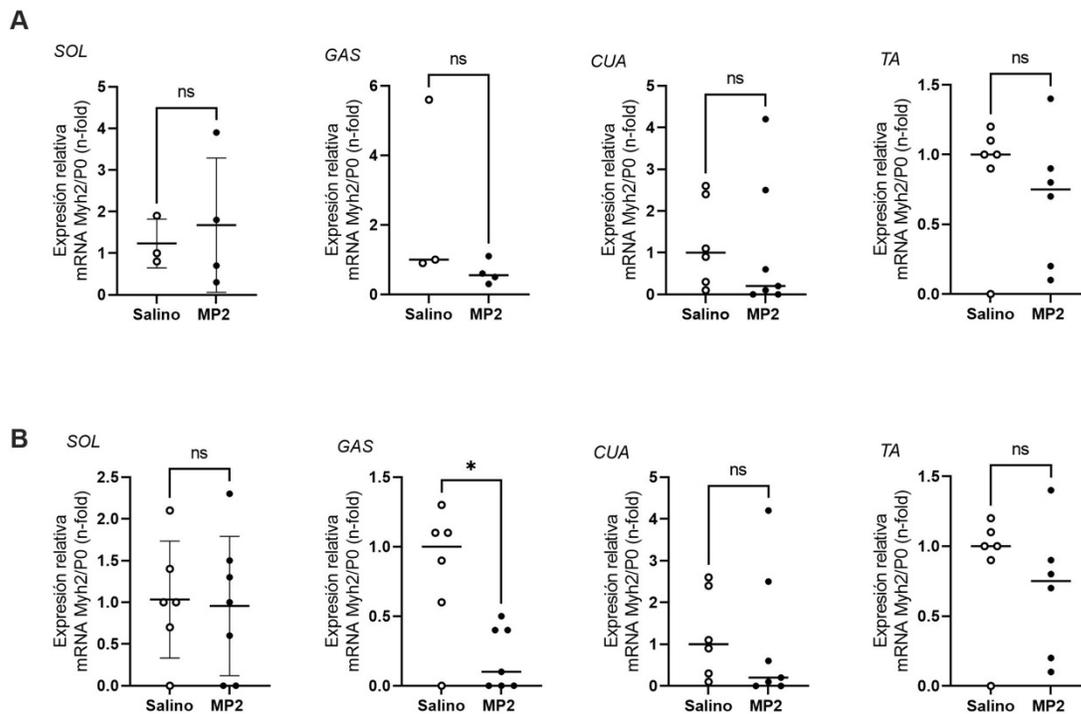
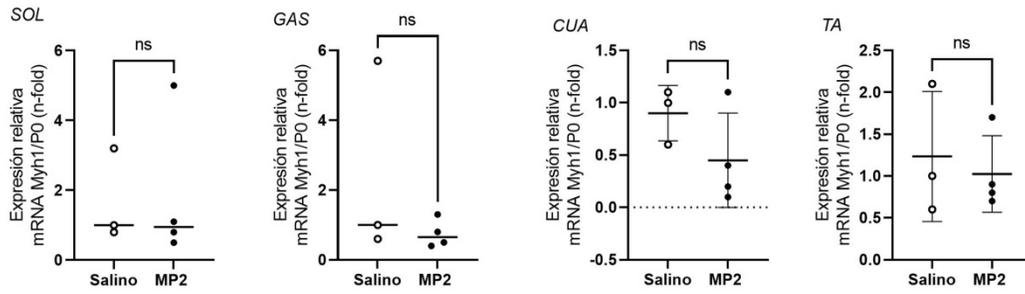


Figura 13. Efectos del suministro crónico de MP2 o Solución Salina sobre la abundancia relativa de los transcritos de Cadena Pesada de Miosina tipo IIa (*Myh2*) evaluado por RT qPCR. A) Comparación de los valores de la expresión relativa de mRNA de *Myh2* después del tratamiento I.P. durante 4 a 6 semanas con MP2 y Solución salina de los músculos SOL, GAS, CUA y TA. Cada punto representa el promedio (\pm SD) o mediana de 4 animales en el grupo MP2 y 3 animales en grupo control, al término del tratamiento I.P. B) Comparación de los valores promedios (\pm SD) o mediana de la expresión relativa de mRNA de *Myh2* después del tratamiento I.P. durante 8 a 10 semanas con MP2 y Solución salina de los músculos SOL, GAS, CUA y TA. * $p=0.08$.

Las Figuras 14A y 14B muestran los resultados del análisis de la expresión de mRNA del gen *Myh1*, evaluado por RT-qPCR de los músculos Sóleo, Gastrocnemio, Cuádriceps y Tibial Anterior de las extremidades inferiores de ratones adultos tratados con MP2 o solución Salina durante 4 a 6 y 8 a 10 semanas con inyección I.P. Los resultados muestran que los grupos MP2 y Salino no presentaron diferencias significativas en la expresión del gen *Myh1* en ninguno de los músculos estudiados. Los niveles de expresión del gen *Myh1* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo Salino tratado entre 4 a 6 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: SOL: 0,8-3,2 veces; GAS: 0,6-1,3 veces; CUA: 0,6-1,1 veces; TA: 0,6-2,1 veces. Los niveles de expresión del gen *Myh2* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo MP2 tratado entre 4 a 6 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: SOL: 0,5-5 veces; GAS: 0,5-1,3 veces; CUA: 0,2-1,1 veces; TA: 0,7-1,7 veces. Los niveles de expresión del gen *Myh2* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo Salino tratado entre 8 a 10 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: SOL: 0-3 veces; GAS: 0-1,4 veces; CUA: 0,1-1,3 veces; TA: 0-1,5 veces. Los niveles de expresión del gen *Myh2* de cada músculo estudiado pertenecientes al grupo MP2 tratado entre 8 a 10 semanas, evaluado como las veces de cambio, fueron: SOL: 0-2,4 veces; GAS: 0-1,1 veces; CUA: 0-2,2 veces; TA: 0,6-2,2 veces.

En resumen, los estudio de la abundancia relativa de transcritos característicos de fibras rápidas/lentas no mostraron efectos significativos del tratamiento crónico con MP2 sobre el fenotipo muscular.

A



B

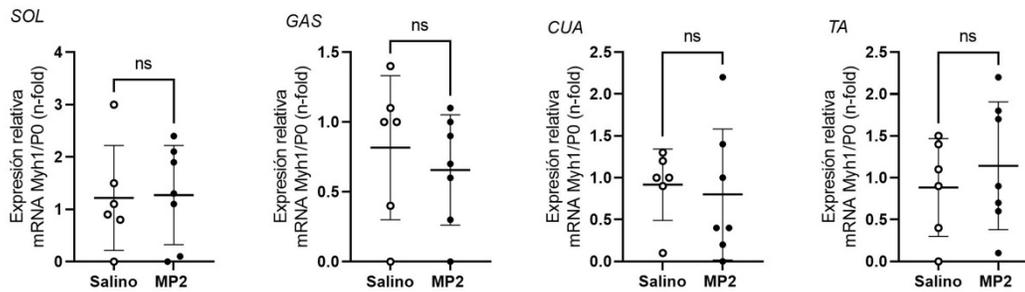


Figura 14. Efectos del suministro crónico de MP2 o Solución Salina sobre la abundancia relativa de los transcritos de Cadena Pesada de Miosina tipo IIx (*Myh1*) evaluado por RT qPCR. A) Comparación de los valores de la expresión relativa de mRNA de *Myh1* después del tratamiento I.P. durante 4 a 6 semanas con MP2 y Solución salina de los músculos SOL, GAS, CUA y TA.. Cada punto representa el promedio (\pm SD) o mediana de 4 animales en el grupo MP2 y 3 animales en grupo control, al término del tratamiento I.P. B) Comparación de los valores promedios (\pm SD) o mediana de la expresión relativa de mRNA de *Myh1* después del tratamiento I.P. durante 8 a 10 semanas con MP2 y Solución salina de los músculos SOL, GAS, CUA y TA.

Actividad enzimática de SDH en cortes histológicos de músculos de las extremidades inferiores de ratones tratados durante 4 a 6 y 8 a 10 semanas con MP2 o Solución Salina.

La Figura 15 muestra los resultados de la medición de la actividad enzimática de Succinato Deshidrogenasa (SDH), que se correlaciona con la capacidad oxidativa de la fibra muscular, medida en cortes con un grosor de 12 μm de los músculos Cuádriceps (*CUA*), Gastrocnemio (*GAS*) Y Tibial Anterior (*TA*) de ratones adultos tratados con MP2 o Solución Salina durante 4 a 6 y 8 a 10 semanas. El músculo Sóleo (*SOL*) no se consideró en los resultados debido a que la marca de SDH se encuentra en todas las fibras del músculo y no es posible hacer diferencias entre fibras (Anexo 1). La Figura 15A muestra los resultados del porcentaje (%) de fibras marcadas y no marcadas del total de fibras contadas en los cortes musculares (*GAS*, *CUA*, *TA*) tratados durante 4 a 6 semanas con MP2 o Solución Salina. Se observó que la diferencia entre los grupos MP2 y Salino de los cortes de cada músculo con marca positiva para SDH (con SDH) y sin marca para SDH (sin SDH) no es significativa. La Figura 15B muestra los resultados del porcentaje (%) de fibras marcadas y no marcadas del total de fibras contadas en los cortes de cada músculo (*GAS*, *CUA*, *TA*) de los grupos tratados durante 8 a 10 semanas con MP2 o Solución Salina. En los resultados de este análisis se observó que los cortes del músculo *TA* sí presentaron diferencias significativas entre el grupo MP2 y Salino. El grupo MP2 tuvo menor porcentaje de fibras con marca para SDH (con SDH) comparado con el grupo Salino, y por tanto, este mismo grupo tuvo menor porcentaje de fibras sin actividad enzimática de SDH (sin SDH) comparado con el Salino ($p=0.012$ y $p=0.02$, respectivamente). Estos resultados sugieren que el tratamiento crónico con MP2 no tiene efectos sobre la actividad enzimática de SDH. A pesar de esto, existen animales que sí responden al tratamiento con MP2 y que presentaron una baja significativa de la actividad enzimática de SDH respecto a los animales del mismo grupo (MP2 8-10 semanas).

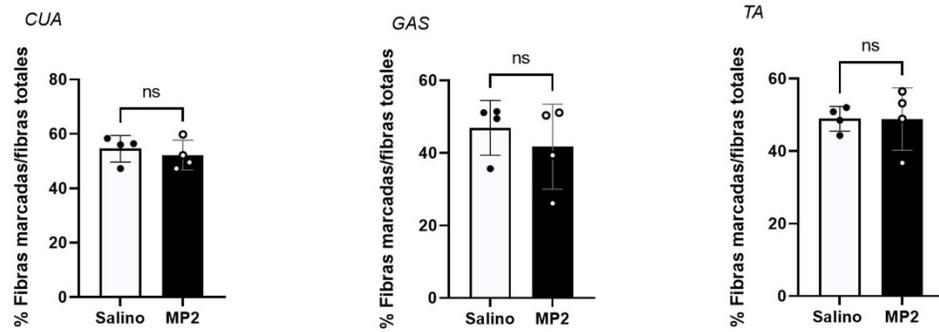
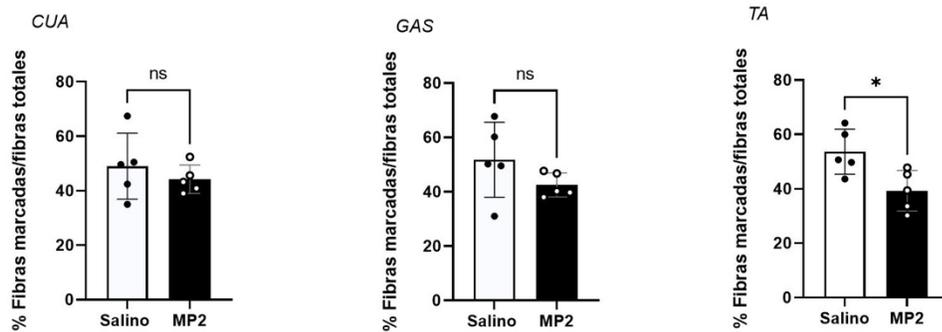
A**B**

Figura 15. Efectos del suministro crónico de MP2 o Solución Salina sobre la actividad enzimática de Succinato Deshidrogenasa (SDH) en ratones adultos. A) Comparación de la actividad enzimática de SDH en los músculos Cuádriceps (CUA), Gastrocnemio (GAS) y Tibial Anterior (TA) de los grupos tratados durante 4 a 6 semanas con Solución Salina (n=5 ratones; 2 cortes por animal y por músculo) y MP2 (n=5), expresados como el promedio \pm SD. B) Comparación de la actividad enzimática de SDH en los músculos Cuádriceps (CUA), Gastrocnemio (GAS) y Tibial Anterior (TA) de los grupos tratados durante 8 a 10 semanas con Solución Salina (n=5) y MP2 (n=5), expresados como el promedio \pm SD. Con SDH *p=0.02.

Efectos del suministro in vivo de MP2 sobre la Presión Arterial de ratones adultos.

Debido a que MP2 es una molécula similar al nifedipino, (un fármaco con acción antihipertensiva y vasodilatadora que inhibe los canales de calcio tipo L del músculo liso de la pared arterial), se analizó el efecto del tratamiento crónico con MP2 sobre la presión arterial. Observamos que el tratamiento crónico con MP2 no produjo variaciones sobre la presión arterial en ratones adultos, comparado ratones tratados con solución Salina. Adicionalmente, estudiamos el efecto de la inyección aguda de MP2 en comparación con la inyección de nifedipino. Para este experimento, estudiamos los efectos sobre la presión arterial (en ratones anestesiados) mediante un catéter en la raíz de la aorta (vía carótida izquierda) conectado a un transductor de presión. El panel A de la Figura 18 muestra registros de presión representativos obtenidos luego del suministro secuencial de MP2/vehículo, fenilefrina (agonista $\alpha 1$ adrenérgico) y Nifedipino), (I.V, *bolus*). La primera flecha hacia abajo indica el momento de la inyección (100 μ L, 4 s), que fue seguida por la inyección de fenilefrina después de 5 minutos (segunda flecha hacia abajo). Se esperó durante 20 minutos (metabolización de fenilefrina), y se procedió a la inyección de Nifedipino (2 mg/kg peso animal). El trazo de color rojo (inferior) en la misma figura muestra el efecto de MP2 (2mg/kg peso animal) diluida en vehículo (primera flecha hacia abajo), seguido de la inyección de fenilefrina y finalmente la inyección de Nifedipino (2 mg/kg peso animal), como en el registro control. Como se puede observar, la inyección de vehículo o MP2 no causan efectos significativos en la presión arterial. La inyección de fenilefrina produjo un aumento transitorio de la presión arterial, similar al comparar los registros obtenidos después de vehículo o MP2. Adicionalmente, la inyección de Nifedipino causó una marcada respuesta hipotensora, similar al comparar registros de animales que inicialmente recibieron vehículo o MP2. Para realizar comparaciones de estos efectos, se calculó la presión arterial media la (PAM) basal y después de la inyección con Vehículo, MP2 o fenilefrina (panel B). Como resume la figura 18B, la inyección de MP2 o vehículo no causaron efectos significativos sobre la PAM en comparación con la PAM basal.

Además, el aumento de expresión causado por la inyección de fenilefrina fue similar al comparar los animales que previamente recibieron vehículo con los animales que recibieron previamente MP2. La respuesta hipotensora observada después de la inyección de nifedipino fue similar al comparar control vs. MP2. La Figura 18C muestra la comparación del efecto sobre la PAM, calculado como cambio de presión arterial en relación al basal (delta PAM). Se observó que el MP2 y la solución Vehículo no tienen efectos sobre la PAM y no varían significativamente entre ambas. Además, el efecto de la inyección de fenilefrina (posterior a Vehículo) comparado con el efecto de la inyección de Fenilefrina (posterior a MP2), aumentan la PAM de igual manera. Finalmente, nifedipino disminuye en igual proporción al comparar posterior a Vehículo o posterior a MP2. Es decir, a pesar de que MP2 pertenece a la familia de las dihidropiridinas y es similar al nifedipino, no tiene efectos sobre la presión arterial, indicando que no posee acción vasodilatadora a las dosis estudiadas. Estos resultados sugieren que MP2 no afecta la corriente de Calcio tipo L del músculo liso vascular.

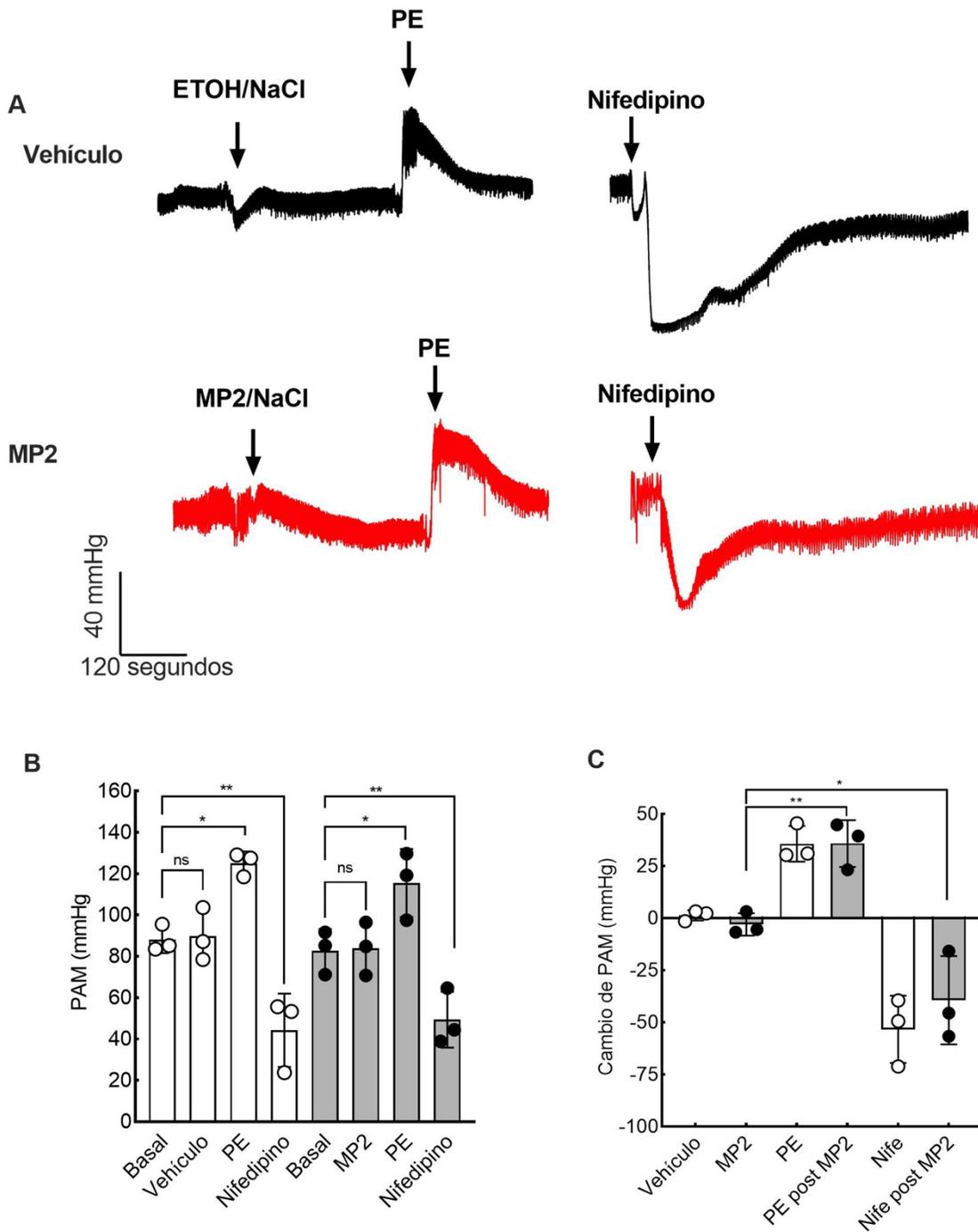


Figura 18. Efectos del suministro in vivo de MP2, Fenilefrina y Nifedipino sobre el mecanismo Barorreflejo y Presión Arterial Media (PAM) de ratones adultos. A) Curso temporal de la respuesta barorrefleja y PAM, medidas con un transductor de presión canulado a través de la arteria carótida izquierda hasta el llamado aórtico, después del tratamiento con MP2 o Vehículo (fármaco (2mg/Kg peso animal, 100µL) o ETOH puro + NaCl 0.9%, 100µL), Fenilefrina (0,1mg/µL, 50µL) y Nifedipino (2mg/Kg peso animal + NaCl 0.9%,

100 μ L), inyectados por la vía del Seno Venoso Retroorbital de ratones adultos (n=4). B) Comparación de la PAM (mmHg) entre la PAM Basal y la respuesta a la inyección con solución Vehículo o MP2, Fenilefrina y Nifedipino, expresada como el promedio \pm SD de 4 animales tratados. C) Comparación de la variación de la PAM (mmHg) entre la solución Vehículo y MP2; Fenilefrina después de la inyección con solución Vehículo y MP2; y Nifedipino después de la inyección de Fenilefrina a un ratón tratado con Vehículo o MP2. *p<0.05; **p<0.01

DISCUSIÓN

a) *Estudios del efecto de MP2 sobre la función muscular en ratones adultos sanos.*

Los resultados del presente trabajo de tesis muestran que el tratamiento con MP2 en ratones jóvenes y sanos, no produce cambios significativos en su fenotipo ni en su función, a diferencia del tratamiento de ratones envejecidos, donde MP2 genera importantes mejorías en la función muscular. Lo anterior, puede deberse a que, a diferencia de los ratones adultos sanos, los ratones envejecidos presentan un importante deterioro de la función muscular y sarcopenia, con un fenotipo de fibra predominantemente lento. La evidencia de la literatura muestra que los ratones envejecidos presentan una importante pérdida de la función muscular, cambio en la composición corporal con predominancia del tejido adiposo por sobre el muscular (Ou et al., 2022), disminución de la temperatura corporal basal y disfunción neuromuscular (Shoji & Miyakawa, 2019). Además, de manera importante para nuestro estudio, los músculo de ratones envejecidos muestran una concentración extracelular de ATP basal alterada, siendo significativamente mayor que la concentración de ATP basal en condición normal. Los ratones envejecidos que se estudiaron previamente en el laboratorio mostraron un muy bajo rendimiento en la prueba funcional *weight test*, y una mejora significativa de esta posterior al tratamiento MP2. En este contexto, el tratamiento con MP2 durante dos semanas mejoró la funcionalidad muscular en relación al grupo control. Estos resultados ocurren probablemente debido al efecto inhibitorio de MP2 sobre la salida de ATP, que regula los niveles extracelulares de esta molécula en esta condición.

Los modelos experimentales de estudio de la función muscular en animales mediante la realización de ejercicio y medición de capacidad funcional son fundamentales para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (Graber et al., 2021). El uso de estas herramientas para la evaluación de la capacidad física de los animales se consideró relevante en este trabajo. Evaluamos la función muscular de los animales antes y después del tratamiento con MP2 o Solución Salina, midiendo diferentes cualidades físicas: la fuerza máxima, la resistencia cardiorrespiratoria y la coordinación neuromuscular. Aplicamos tres pruebas funcionales específicas con

protocolos validados y descritos previamente en la literatura. La evaluación de la fuerza de ratones a través de un protocolo conocido de Weight test (Deacon, 2013). Además, a diferencia de otros animales de experimentación, los ratones adultos pueden soportar fácilmente su propio peso corporal, incluso usando solo las patas delanteras o traseras (Deacon, 2013), por lo que el uso de este tipo animal fue adecuado para realizar este tipo de medición. Por otro lado, dentro de los modelos utilizados para medir fuerza, el *weight test* permite seguir los principios del entrenamiento de resistencia progresivo (p. ej., aumentar el peso en puntos de tiempo específicos). Por otra parte, la experiencia previa del examinador resultó ser fundamental para la correcta obtención de los resultados debido a que esta prueba es particularmente compleja en términos del comportamiento y capacidad individual de cada animal (Aartsma-Rus et al., 2008). La adaptación del protocolo a las necesidades y fortalezas/debilidades de cada individuo nos permitió evaluar la capacidad de fuerza máxima de manera reproducible, sin la necesidad de utilizar métodos invasivos que buscaran inducir la participación del animal a través de la condición operante (evitación del castigo) o por factores estresantes externos (Graber et al., 2019). Los resultados observados en esta prueba, dieron cuenta de que a pesar de las cualidades intrínsecas y características individuales (peso, fecha de nacimiento, condición física basal, etc.) de cada animal, los grupos tratados con MP2 o Salino tuvieron un comportamiento similar antes y después del tratamiento. Ambos grupos presentaron aumento progresivo de la curva de fuerza máxima/peso, hasta alcanzar su valor máximo, donde se mantienen constantes en un valor de meseta.. En general, los ratones se adaptaron paulatinamente a sostener pesos cada vez más pesados y a producir más fuerza, contemplado en un breve período de aclimatación y medición. Estas adaptaciones fueron consistentes con la teoría del volumen de entrenamiento y la capacidad de respuesta al ejercicio (American College of Sports Medicine by Nicholas A. Ratamess, 2009). Al comparar la producción de fuerza del grupo MP2 y Salino hacia el final del período de tratamiento I.P entre 4 a 6 y 8 a 10 semanas, el grupo MP2 presenta una tendencia a producir mayor niveles de fuerza, comparado con el período previo al tratamiento, sin mostrar

significancia en el resultado. En general, los estudios que han evaluado producción de fuerza máxima posterior a tratamientos farmacológicos o producto de un programa de ejercicio, contemplan tres períodos de ejercicio: i) aclimatación, donde se mide la condición física basal, con una duración aproximada de 1 semana; ii) entrenamiento, con una duración aprox. desde 12 semanas y hasta meses y; iii) pruebas funcionales para medir el efecto del tratamiento sobre el rendimiento físico (aprox. 1 semana) (Graber et al., 2019). Sin embargo, en este trabajo no se contempló el período de entrenamiento debido a que este podría haber mejorado la función física y la contractilidad muscular (Graber et al., 2019) pudiendo inducir adaptaciones físicas independientes del tratamiento con MP2. Como se esperaba, el grupo Salino que fue sometido al mismo protocolo de medición y al mismo evaluador, no tuvo mejoras significativas en su fuerza máxima. Además, a diferencia de estudios que comparan más de una intervención sobre la función física, el uso de un único estímulo (MP2) sobre la función muscular nos permitió asociar directamente la intervención de la droga sobre las distintas capacidades físicas evaluadas en este trabajo.

Debido a que la utilización de la droga en ratones envejecidos no sólo produjo mejoras en la fuerza sino también en la capacidad cardiorrespiratoria y función neuromuscular, decidimos evaluar la función cardiorrespiratoria y coordinación neuromuscular. Como el entrenamiento de resistencia cardiorrespiratorio ha sido bien establecido en modelos de roedores corriendo en cintas rodantes o nadando durante largos períodos de tiempo (Kregel et al. 2006; Kilikevicius et al. 2013) y los protocolos de Rotarod han sido ampliamente utilizados para evaluar la función motora general (Seldeen et al., 2018). Basados en el modelo experimental y en los resultados de Carrel EM, et al. (2016), utilizamos dos protocolos diferentes de Rotarod para medir la coordinación motora y resistencia de los animales tratados con MP2 o Salino. Así, utilizamos un protocolo para evaluar la resistencia de los ratones en Rotarod durante 1h (contando el número de caídas), de manera similar a lo realizado por otros investigadores que han utilizado este mismo instrumento con protocolos parecidos al que usamos en este trabajo, los que contemplan sobre

30 minutos y hasta 1 hora de ejercicio continuo, con aceleración constante o pequeñas variaciones de rpm (D'Arcangelo et al., 2017; Rineau et al., 2021). La función cardiorrespiratoria de los animales tratados con MP2 mostró tener menor rendimiento respecto al grupo Salino después del tratamiento I.P y respecto a su condición basal, previa al tratamiento. A pesar de eso, y probablemente debido a la elección azarosa de los grupos, el grupo MP2 siempre mantuvo un menor rendimiento que el grupo Salino, en las curvas antes y después del tratamiento. Resulta interesante comparar estos datos con los resultados obtenidos por Rustay y cols. (2003) donde se mostró que el rendimiento de los ratones tratados con etanol en baja dosis produce mejoras en el rendimiento de los animales. Además, se observó que los animales sometidos a un protocolo que contemplaba un período de preentrenamiento tuvieron mayor rendimiento en el período de medición de la prueba que el grupo de animales que no se sometió este mismo período y, la acción de la droga se pudo probar de manera más robusta (Rustay et al., 2003). Por otra parte, es posible que la capacidad oxidativa de los animales haya disminuido en algún grado en función del aumento de la producción de fuerza. Estos resultados avalan la idea de Van Wessel, et al. (2010) donde se describe que una reducción en la capacidad oxidativa, para aliviar las posibles limitaciones de difusión del crecimiento de la fibra durante la sobrecarga, va en contra de las adaptaciones del entrenamiento de resistencia y viceversa (van Wessel et al., 2010). Por lo tanto, es de esperarse que las adaptaciones inducidas por sobrecarga se atenúen con el ejercicio de resistencia, y que los aumentos en la capacidad oxidativa en respuesta al ejercicio de resistencia se atenúen cuando se acompañan de un estímulo hipertrófico (Hendrickse et al., 2020). A pesar de que los cambios no se mostraron de manera robusta, puede que la tendencia a aumentar la fuerza máxima observada en los ratones tratados con MP2 tenga relación con la disminución en el rendimiento observado en las pruebas de RotaRod. Según Bohlen (2008), la prueba de Rotarod con aceleración progresiva se utiliza ampliamente para evaluar los efectos genéticos y de drogas sobre la función motora, pero sus resultados presentan amplias diferencias de acuerdo al modelo del instrumento utilizado y las

condiciones ambientales del laboratorio (Bohlen et al., 2009). Por otro lado, estudios sobre cepas endogámicas de ratones han proporcionado evidencia empírica de que la latencia entre los tiempos de inicio y caída está relacionada con la coordinación motora, el equilibrio y las habilidades individuales de aprendizaje motor del roedor (Chapillon et al., 1998; Crawley, n.d.; Rustay et al., 2003). En la prueba de Rotarod para medir función motora y coordinación neuromuscular, los resultados mostraron que el uso crónico de MP2 no produce mejoras en el rendimiento de los ratones. Contrario a lo que se podría esperar respecto a la acción de MP2 sobre la función motora de los ratones, disminuyendo el número de caídas de los animales tratados con la droga, los resultados podrían responder a que la droga no produce mejoras en la prueba específica evaluada y, además, que existe un factor asociado al crecimiento de los animales donde se produce un aumento de peso asociado a este, el cual podría haber dificultado la capacidad del ratón de mantenerse sobre la rueda (Graber et al., 2013). Por otra parte, las condiciones intrínsecas de los animales pertenecientes a cada grupo se evidenciaron claramente, mostrando desde el principio una diferencia significativa en el rendimiento de la prueba (Crawley, n.d.; Rustay et al., 2003).

Los experimentos realizados en este trabajo de tesis coinciden con resultados previos del laboratorio FCM, que muestran que la incubación de fibras del músculo FDB en presencia de MP2 (30 minutos, a 37°C) produce una disminución de la salida de ATP tras la aplicación de un estímulo eléctrico de baja frecuencia (20 Hz). Es importante comentar que la estimulación eléctrica de baja frecuencia sería similar a los ejercicios repetitivos de baja intensidad, propiciando la presencia de un fenotipo lento. Por lo tanto, nos parece necesario evaluar el efecto del tratamiento con MP2 bajo régimen de ejercicio de fuerza, y evaluar si acelera y/o potencia el trofismo muscular, el desarrollo de fuerza y el fenotipo rápido. Alternativamente, se podría esperar que frente al desarrollo de un régimen de ejercicio cardiorrespiratorio (de resistencia), MP2 inhibiera el cambio fenotípico hacia fibras lentas y mostrara un cambio exiguo hacia este fenotipo. Según señala DeNardi y cols. (1993), las fibras híbridas intermedias, que contienen MyHC de tipo 1 y 2A, o 2A y 2X, o 2X y

2B, son frecuentes en los músculos normales (DeNardi et al., 1993) y se vuelven más numerosas cuando se producen cambios de tipo de fibra como respuesta a estímulos tales como ejercicio físico (Klitgaard et al., 1990), estimulación eléctrica (Maier et al., 1988) o atrofia por denervación (Patterson et al., 2006). El desuso muscular conduce a una pérdida de la masa muscular y la síntesis de proteínas musculares (Andersen et al., 1999), que muestran un desajuste entre los niveles de isoformas de MyHC revelados por inmunohistoquímica y los de los ARNm correspondientes revelados por hibridación in situ, debido a la diferente renovación de las proteínas y transcripciones de MyHC. Estas fibras desajustadas, indicativas de fibras musculares en un estado de transición, aumenta después de un período de reposo en cama en el músculo esquelético humano (Andersen et al., 1999). La potencia muscular disminuye en proporción a la reducción de la masa muscular, mientras que la fuerza disminuye aún más rápidamente (5 % por semana) lo que indica una reducción de la fuerza normalizada. La atrofia, es decir, la disminución del área de la sección transversal, la pérdida de fuerza y potencia también son detectables en fibras musculares individuales y más pronunciadas en las fibras lentas que en las rápidas (Blaauw et al., 2013). Como en este trabajo se utilizaron animales sanos que estuvieron un período largo de tiempo sin estímulos físicos (período de inyecciones de la droga y solución salina entre 4 y 10 semanas), las mediciones físicas que no se realizaron durante el período de tiempo de inyecciones no nos permitió mantener un registro continuo de la variación de la función muscular en función del suministro de la droga.

En general, los resultados de nuestro trabajo mostraron que no existe un cambio significativo de la función muscular, evaluadas con diversas aproximaciones experimentales, pero sí existe una tendencia al alza de fuerza y disminución de la función cardiorrespiratoria/motora, que podría verse expresada de manera significativa con un mayor número de animales estudiados o con la medición periódica de las funciones estudiadas.

b) Estudios del efecto de MP2 sobre el fenotipo de fibras musculares en ratones adultos.

Los cambios en el tipo de fibra reflejan una reprogramación de la transcripción génica, que conduce a una remodelación de las propiedades contráctiles de la fibra (transiciones lentas-rápidas) y/o del perfil metabólico (transiciones oxidativas-glucolíticas). Quezada y cols. (2021) demostraron que la estimulación eléctrica de baja frecuencia de fibras del FDB de ratón, produce una disminución en los niveles de ARNm de MCU, MICU1, MICU2 y EMRE (Quezada et al., 2021). Estos autores sugieren que la estimulación eléctrica de baja frecuencia podrían reflejar la transición fenotípica de una fibra rápida a lenta, específicamente en las mitocondrias. Posteriormente, Jorquera y cols. (2013) reportaron que el aumento en la expresión de genes lentos posterior a una estimulación eléctrica de baja frecuencia (20Hz) en cultivo de fibras musculares aisladas, es inhibida en presencia de Nifedipino (Jorquera et al., 2013). Suponiendo que MP2 al tener una estructura química similar al Nifedipino y que puede interferir con la cascada de señalización PA-Cav1.1-Panx-1 de modo similar a nifedipino, evaluamos el efecto del tratamiento crónico con MP2 sobre la abundancia de los transcritos de diversos genes estructurales de la fibra muscular (*Tnls*, *Tnlf*, *myh1*, *myh2*, *myh7*) y de un gen metabólico (*Eno3*), en músculos con distintos fenotipos de ratones adultos sanos. A partir de estos experimentos, no encontramos diferencias significativas al comparar los niveles de transcritos de grupo MP2 con entre el grupo Salino para la mayoría de los genes estudiados. Sólo dos músculos mostraron cambios significativos. El Sóleo presentó un aumento en la expresión de mRNA del gen *Tnlf* y el músculo Gastrocnemio disminuyó la expresión de mRNA del gen *Myh2*, ambos comparados contra el grupo Salino y después de 8 a 10 semanas de tratamiento. Esto podría estar relacionado con el efecto potenciador de MP2 hacia la presencia de un fenotipo rápido y, el período de desuso muscular (tiempo de inyección de droga y salino durante 4 a 10 semanas), los que hayan, posiblemente, promovido el aumento en la expresión de un gen rápido (*Tnlf*), según señala Blaauw y cols. (2013), en relación al estímulo que produce el desuso muscular (Blaauw et al.,

2013). Por otro parte, es posible que el músculo Gastrocnemio haya tenido una disminución de MyHC IIa, mostrando una tendencia o un proceso de transición en el cambio de fenotipo de fibra, consecuente con lo observado por Pette y cols. (1988), donde midieron porcentualmente el número de las distintas MyHC del músculo EDL (fenotipo rápido, similar al gastrocnemio) como respuesta a estimulación eléctrica de baja frecuencia (10 Hz), observando aumento y disminución de MyHC IIb relacionado directamente con el tiempo de estimulación (Pette & Vrbovn, 1992.), lo que podría indicar que aunque se produzcan estímulos específicos que conducen a un cierto fenotipo, los cambios plásticos responden de manera diferencial de acuerdo a otros factores, como por ejemplo, el tiempo de aplicación del estímulo. En líneas generales, los resultados de los estudios de abundancia de transcritos de proteínas contráctiles y de la enzima enolasa, son consistentes con los estudios funcionales, que mostraron ausencia de efecto o efecto levemente superior (weight test) por el tratamiento de MP2. Lo que indicaría que, a pesar de que MP2 no tiene efectos potentes observables en todos los músculos estudiados, en su función y fenotipo muscular, existe una tendencia al alza de la fuerza muscular y aumento de una proteína contráctil específica del fenotipo rápido (TnIf) en un músculo de fenotipo lento (Sóleo). Por otra parte, de acuerdo a estudios previos encontrados en la literatura, donde se muestra que estímulos de larga duración y elevada intensidad son necesarios para lograr cambios fenotípicos de la fibra a nivel molecular, los resultado de este estudio son consecuentes con estas observaciones. Por ejemplo, Patterson y cols. (2006), observaron una marcada disminución de la proporción de fibras puras y un notable aumento del número de fibras híbridas que expresaban dos isoformas de MyHC en ambos músculos, pero sólo luego de un período crónico de denervación (>50 días) de un músculo rápido (EDL) y un músculo lento (SOL). Más aun, 50 días después de la denervación, el 75% de las fibras muestreadas de los músculos EDL y SOL eran fibras híbridas de tipo IIB/D (7/8) y I/IIA (10/13), respectivamente, y no presentaban un fenotipo predominante (Patterson et al., 2006). Estudios como éste y otros muestran que, a pesar de que el estímulo neural afecta ampliamente el

fenotipo de la fibra, este no implica necesariamente cambios paralelos de genes para proteínas contráctiles proporcionales con los cambios en la expresión de proteínas del metabolismo. Otro ejemplo que avala esta idea mostró que cuando el músculo extensor digitorum longus (EDL) de la rata, un músculo típicamente de contracción rápida, fue inervado de forma cruzada por el nervio del músculo sóleo (SOL, de contracción lenta), el curso del tiempo de contracción del músculo inervado de forma cruzada permaneció considerablemente más rápido que la contracción del músculo SOL típico, incluso 16 meses después de la inervación cruzada (Close, 1967, 1969). En esta línea, nuestro diseño experimental omitió la modificación de la actividad neural (no aplicamos régimen de ejercicio, ni estimulación eléctrica o denervación), con la intención de evaluar en forma preferencial la acción de MP2 sobre músculos con actividad física habitual. Por ello, la aparente ausencia de efecto podría reflejar que MP2 tiene una acción moduladora, que se manifestará en condiciones en que se modifique la actividad neural en sujetos sanos, a través de la potenciación de otro estímulo, y por ende los programas de expresión génica.

Según lo señalado anteriormente, sabemos que las isoformas de las cadenas pesadas de miosina (*MyHC*) y troponinas inhibitorias (*Tnl*) son utilizadas como marcadores de tipos de fibra y, las transiciones en el tipo de fibras musculares pueden ser detectadas midiendo la variación en la expresión de estas. En los músculos esqueléticos adultos el cambio de tipo de fibra puede ser inducido, entre otros, por cambios en la actividad nerviosa, en la carga o por influencias hormonales. En los músculos de las extremidades y del tronco de los mamíferos, el cambio de tipo de fibra o la transición en la expresión de isoformas de miosina se produce de forma ordenada según la regla del "vecino más cercano": $1 \leftrightarrow 2A \leftrightarrow 2X \leftrightarrow 2B$ (Ausoni et al., 1990). Un cambio de fenotipo lento a rápido en la dirección $1 \rightarrow 2A \rightarrow 2X \rightarrow 2B$ puede ser inducido por una estimulación eléctrica fásica de alta frecuencia, que se asemeja al patrón de disparo de las neuronas motoras rápidas, por la descarga muscular causada por la suspensión de las extremidades posteriores, por el desuso, microgravedad o por el hipertiroidismo. Cuando los mismos factores operan en diferentes músculos de una determinada especie

animal, los cambios reales que se producen en un músculo determinado vienen dictados por (i) la composición del tipo de fibra de los músculos al comienzo del experimento y (ii) la existencia de diferencias intrínsecas entre los músculos que limitan la gama de adaptaciones posibles. Esto puede llevar incluso a cambios en direcciones opuestas del mismo tipo de MyHC/fibra en diferentes músculos en respuesta a la misma condición. La regulación antitética del mismo gen en dos músculos diferentes puede explicarse si consideramos la composición del tipo de fibra al comienzo de la respuesta adaptativa. Por ejemplo, el músculo sóleo de ratón está compuesto principalmente por fibras de tipo I lentas, mientras que los músculos gastrocnemio y tibial anterior se componen principalmente por fibras rápidas tipo IIb y IIx. Por tanto, el cambio 1→2A→2X→2B va a producir necesariamente una pérdida del componente I y IIa para los músculos de fenotipo rápido mientras que va a producir un aumento en los músculos lentos (Blaauw et al., 2013b). El análisis de la expresión de genes lentos y rápidos en los grupos tratados con droga para los distintos grupos musculares dieron cuenta de que no existe una variación significativa del fenotipo característico de todos los músculos estudiados, posterior al período de tratamiento con la droga. Sin embargo, se observó que en algunos casos que para un mismo músculo, hubo aumentos y disminuciones de genes rápidos y lentos, indistintamente de su fenotipo inicial, frente al mismo estímulo. Estas diferencias podrían reflejar una regulación antitética al estímulo dado en grupos musculares con distinto fenotipo, según lo reportado por Ausoni y cols. (1990). En este sentido, la noción de un rango adaptativo limitado debe considerar 3 factores: (i) la diferencia entre las especies, por ejemplo, la estimulación eléctrica de baja frecuencia es capaz de inducir mayores cambios en la expresión de miosina lenta en músculos rápidos de conejo que en roedores; (ii) el tiempo necesario para la respuesta adaptativa ya que, por ejemplo, la estimulación eléctrica de baja frecuencia durante 2 meses no conduce a una expresión significativa de MyHC I en músculos rápidos de rata (Ausoni et al., 1990; Termin A et al., 1989), pero podría ser detectado luego de 4 meses y, (iii) los efectos aditivos de dos o más estímulos que inducen un tipo de transición similar. Por ejemplo, el efecto combinado de

hipertiroidismo y descarga mecánica, ambos estimulando una transición desde lenta a rápida, puede inducir una expresión significativa de MyHC-2B en los músculos lentos (Caiozzo et al., 1998), mientras que el hipotiroidismo combinado con la estimulación crónica de baja frecuencia (CLFS) o sobrecarga puede inducir una expresión significativa de MyHC-slow en los músculos rápidos (Caiozzo et al., 2000; Kirschbaum et al., 1990). A partir de los resultados en la expresión de genes observados en este trabajo es posible inferir que el estímulo de tratamiento con droga MP2 entre 4-6 y 8-10 semanas no fue suficiente para generar cambios a nivel transcripcional en los músculos observados o que los efectos de la droga sobre la transición fenotípica tengan un menor efecto en los ratones adultos sin enfermedad. Cabe destacar que, en algunos casos, la restricción de transiciones de tipo de fibra parece estar relacionada no sólo con la diversidad entre los músculos (músculos rápidos frente a músculos lentos), sino también con la diversidad entre las fibras individuales de un músculo con fenotipo aparentemente idéntico. Por ejemplo, la denervación o descarga de un músculo Sóleo de rata producirá un aumento en la expresión de genes MyHC 2A en algunas fibras musculares, pero no en todas. Se cree que la generación primaria de fibras está estrictamente comprometida con un fenotipo determinado, mientras que la generación secundaria de fibras podría ser más proclive a la plasticidad (Newlands et al., 1998; Schiaffino & Reggiani, 1996).

Complementariamente a los estudios de abundancia de transcritos codificantes para proteínas contráctiles, intentamos medir el inmunomarcaje de cadenas pesadas de miosina por inmunofluorescencia en secciones de los músculos de la extremidad posterior de ambos grupos experimentales, para tratamiento de 4-6 y 8-10 semanas de duración. Sin embargo, sólo logramos marcaje inespecífico, debido probablemente a la unión del anticuerpo secundario a proteínas de membrana y/o intersticiales. Entre las estrategias que aplicamos para resolver el problema podemos enumerar: dilución mayor de los anticuerpos, incubación con el agente de bloqueo durante más tiempo, preincubación con glicina. Nuestros experimentos de inmunomarcaje omitiendo el anticuerpo primario demostraron que el marcaje

inespecífico se debe al anticuerpo secundario. Estudios futuros utilizando nuevos anticuerpos secundario podrían solucionar este problema.

Nuestros estudios sobre cambios del fenotipo metabólico de las fibras de los músculos de las extremidades posteriores fueron, en general, congruentes con los otros resultados de este trabajo. Es decir, no encontramos cambios estadísticamente significativos en la abundancia del mRNA de enolasa, ni tampoco en la actividad enzimática SDH estudiada en cortes histológicos. La enzima succinato deshidrogenasa (SDH) es parte de un complejo de 4 subunidades y forma parte clave del metabolismo oxidativo llevado a cabo por las mitocondrias dentro de la célula muscular esquelética. La actividad de esta enzima es más abundante en músculos que presentan fenotipos lentos como, por ejemplo, el músculo Sóleo. A diferencia de este músculo, el Gastrocnemio presenta una baja actividad de esta enzima puesto que su fenotipo es predominantemente rápido. Como se esperaba, los resultados de este trabajo mostraron que la actividad de la enzima SDH en áreas de cortes histológicos de músculo Sóleo-Gastrocnemio, es significativamente mayor en el Sóleo que en el Gastrocnemio. De hecho, no fue posible contar el número de fibras marcadas y no marcadas en el área del sóleo porque el músculo presenta marca en todas sus fibras. Los cortes de músculos obtenidos a partir de los ratones tratados con MP2 4-6 semanas, no mostraron diferencias significativas en la proporción de fibras con marca para SDH en comparación a los cortes histológicos de ratones del grupo control. Sin embargo, los resultados observados en la reacción de la enzima SDH en algunos cortes tratados entre 8 a 10 semanas con MP2 mostraron tener menos marca de SDH que los músculos tratados con solución salina, pero esta tendencia no logró significancia estadística, pero que podría ser el resultado de una variación de una magnitud que dificulta su detección con la técnica que utilizamos. La variabilidad en la tinción de los cortes histológicos se puede explicar a la heterogeneidad natural en la distribución de fibras SDH+ vs. SDH- diferencias, sumado con la dificultad de obtener cortes/fotografías de registro de la misma zona anatómica de interés. Hendrickse et al. (2020) midió la densidad óptica de SDH y observó que las fibras de la región oxidativa del músculo *plantaris*

derecho, con una distribución heterogénea en el músculo y variable entre individuos. Estudios futuros podrían aumentar el número de cortes analizados, automatizar el método de análisis para considerar idealmente toda una sección transversal del músculo, con cortes seriados, aumentando así la representatividad de cada medición.

Finalmente, resulta interesante comparar los resultados de este trabajo con otros trabajos donde se han realizado tratamientos farmacológicos con el fin de producir cambios plásticos en la fibra muscular. Serrano y cols. (2001) utilizaron ratones denervados y en regeneración para probar el efecto de calcineurina (que promueve la expresión del fenotipo lento) sobre la abundancia de MyHC 2A, 2X y 2B en fibras musculares de Sóleo. Los antecedentes previos habían mostrado que las fibras del músculo sóleo en regeneración tienen una expresión aumentada de MyHC-2A y una expresión disminuida de MyHC-2X y MyHC-2B durante la fase temprana de reinervación. Este cambio MyHC-2X (-2B) hacia MyHC-2A es seguido inmediatamente por un cambio MyHC-2A hacia MyHC-1, de modo que para el día 10 después de la lesión, los músculos del sóleo en regeneración contienen principalmente transcritos MyHC-lento y una proporción menor de MyHC-2A confinado a una pequeña población de fibras. Algo similar a lo que ocurre con la transición de MyHC de un músculo rápido hacia lento después de estimulación eléctrica de baja frecuencia. Se utilizaron dos bloqueadores de calcineurina, ciclosporina A (CsA) y FK506, y un inhibidor de la proteína de dominio de calcineurina (cain/cabin-1). Los investigadores encontraron que el aumento de la cadena pesada de miosina lenta (MyHC) y un promotor de MyHC-lento inducido por las neuronas motoras lentas en el músculo sóleo de rata en regeneración se previene por ciclosporina A (CsA), FK506, y el dominio de la proteína inhibidora de calcineurina de cain/cabin-1. En cambio, los inhibidores de la calcineurina no bloquean el aumento del tamaño de las fibras inducido por la actividad nerviosa en el músculo en regeneración. Además, la activación de MyHC-slow inducida por la electroestimulación directa del músculo regenerado denervado con un patrón de impulso continuo de baja frecuencia es bloqueada por la CsA (Serrano et al., 2001).

Estos resultados muestran que es posible producir cambios plásticos a través del suministro de fármacos que inhiben vías activadoras del fenotipo lento, promoviendo la presencia del fenotipo rápido. Sin embargo, contrario a nuestro trabajo, estos estudios fueron realizados en ratones denervados y en regeneración, por lo que la probabilidad de observar cambios en el fenotipo muscular es mucho mayor que en condiciones normales.

c) Ausencia de efectos de MP2 sobre la presión arterial.

Finalmente, consideramos importante evaluar el efecto de MP2 sobre las variaciones de la presión arterial en el músculo liso vascular, considerando los antecedentes de que el nifedipino ha mostrado tener potentes efectos vasodilatadores e hipotensores sobre venas pulmonares de ratones adultos sanos (resultados no publicados). Para ello, la aproximación experimental utilizada en este trabajo se basó en el trabajo realizado por Zeng y cols. (2018) donde se midió el efecto de la Fenilefrina, agonista α_1 adrenérgico, sobre la respuesta del mecanismo Barorreflejo y la variación de la Presión Arterial *in vivo*. En el presente trabajo de tesis se probó el efecto agudo de MP2 sobre la presión y sobre la respuesta contráctil a fenilefrina. Este efecto fue comparado con la inyección de vehículo. No encontramos diferencias significativas sobre la presión basal o sobre la repuesta hipertensiva a fenilefrina. Además en la segunda parte del experimento inyectamos una dosis equivalente de nifedipino; tanto en los animales que habían recibido inyección de MP2 como en los animales que recibieron inyección de vehículo observamos una caída transitoria de la presión, de magnitud y duración similar. Estos resultados muestran que, MP2 no posee el efecto vasodilatador de nifedipino, y que el pretratamiento con MP2 no afecta la acción hipotensora de nifedipino. Po ende considerando que nifedipino es u bloqueador de canales de tipo L del músculo liso vascular, MP2 no produciría este efecto. Esta es una información que consideramos relevante, ya que indica que MP2 es un fármaco sin efectos hemodinámicos y que se podría utilizar como una herramienta terapéutica para la mejorar de la función muscular. Apoyando esta noción la medición de la presión

arterial de ratones tratados por 8-10 semanas con MP2 no mostro efectos aparentes (n=2 por grupo) en las presiones sistólica o diastólica, en comparación con ratones del grupo Salino. Estudios futuros podrán aumentar el número de observaciones en ratones en tratamiento crónico con la MP2. Adicionalmente se pueden realizar estudios de contractilidad arterial (anillos aórticos) y respuesta de desarrollo de tensión isométrica, evocada por despolarización, y/o vasoconstrictores.

A partir de todos los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se puede concluir que el uso de la droga MP2 sobre ratones adultos sanos no tuvo efectos sobre el aumento de la expresión de genes rápidos y tampoco sobre el cambio de fenotipo de lento a rápido. Se observó una mejora de la fuerza máxima por sobre la capacidad cardiorrespiratoria y coordinación neuromuscular, lo que podría estar asociado al tratamiento crónico con MP2. Sin embargo, hacen falta más estudios que consideren las limitaciones y fortalezas de este trabajo para proponer nuevos diseños experimentales que puedan responder de manera robusta a las preguntas que surgen naturalmente en torno al uso de MP2. Por otra parte, resulta positivo e interesante que los resultados de este trabajo muestren que el uso de MP2 durante un período prolongado de tiempo en individuos sanos, no tenga efectos sobre el fenotipo de las fibras muscular, el metabolismo muscular y tampoco sobre la PAM. Estos resultados comparados con los estudios realizados en ratones viejos, demuestran que el MP2 tiene un potencial uso terapéutico sin mayores efectos secundarios (como alteraciones vasculares) para el tratamiento de la sarcopenia. Además, podría tener un uso exclusivo en cierto tipo de enfermedades y no podría ser utilizado como un posible doping en otros contextos. Resultaría interesante hacer pruebas que utilicen este mismo diseño experimental y MP2 (midiendo genes, prevalencia de tipos de fibra muscular y actividad enzimática) en ratones adultos con presencia de sarcopenia y/o en enfermedades que afecten el correcto funcionamiento del sistema musculoesquelético.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio evaluamos el efecto del tratamiento crónico con MP2, una molécula de diseño, como fármaco para potenciar la función muscular de fuerza y/o el cambio fenotípico hacia fibras rápidas en ratones adultos sanos. Para ello, realizamos estudios funcionales (Weight Test y RotaRod), evaluación del patrón de expresión génica de genes característicos de fibra rápida/lenta de músculos de las extremidades posteriores y de una enzima glicolítica (Enolasa). Además, se midió la actividad oxidativa de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) como indicador del fenotipo metabólico de las fibras. Los resultados muestran que: a) El tratamiento crónico con MP2 no afecta la función muscular en términos de la fuerza muscular, resistencia cardiorrespiratoria y la coordinación neuromuscular, pero muestra una tendencia a potenciar el aumento de la producción de fuerza en ratones tratados con la droga comparado con el grupo salino y con las otras pruebas evaluadas; b) el tratamiento crónico con MP2 no modifica los patrones de expresión de proteínas contráctiles en los músculos de las extremidades posteriores en músculos con fenotipo lento y rápido; c) el tratamiento crónico con MP2 no modifica la expresión ni actividad de enzimas que caracterizan el metabolismo oxidativo/glucolítico de las fibras musculares. Finalmente, los estudios sobre potenciales efectos de MP2 en la presión arterial y la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina indican que: d) MP2, en las dosis utilizadas en este trabajo (2mg/kg diluido en NaCl 0.9%; dilución droga: 10mg/mL MP2/ETOH puro), no interfiere con la función del músculo liso vascular. Estos resultados sugieren que MP2 podría tener un efecto beneficioso, pero de baja magnitud, sobre la capacidad de producir fuerza en ratones adultos sanos, sin producir cambios fenotípicos ni metabólicos en la fibra muscular. Además, los resultados muestran que MP2 no tiene efectos vasodilatadores sobre el músculo liso vascular posterior al suministro crónico y agudo de la droga. Debido a que no observamos la aparición de efectos secundarios o de efectos hemodinámicos con el uso crónico y agudo de MP2, podemos inferir que MP2 es un fármaco con acción

específica y segura sobre la recuperación de función y masa muscular en enfermedades que se presentan con la pérdida de estas.

Dentro de las debilidades de este trabajo, encontramos que: 1) La elección azarosa de los animales para cada grupo (MP2 y Salino), sin modificar la distribución de estos mismos posterior al primer período de pruebas físicas, produjo una diferencia significativa del rendimiento entre ambos grupos, siendo mayor en el grupo Salino, que se mantuvo posterior al tratamiento y que no fue favorable para hacer un relación directa del efecto de la droga sobre la función muscular en las pruebas de resistencia y coordinación neuromuscular principalmente , 2) La administración crónica de la droga y solución salina vía intraperitoneal, pudo haber producido algún grado de estrés en los animales durante el período de tratamiento, según señala Turner y cols. (2011) , afectando de alguna manera el comportamiento de los animales (Patricia V Turner, 2011), 3) El tiempo durante el tratamiento intraperitoneal, que no contempló ningún tipo de medición funcional, pudo habernos dado información valiosa en el caso de haber realizado estas mediciones de manera continua durante el tiempo de tratamiento 4) el número de ratones tratados durante el período de tiempo entre 4 a 6 semanas no fue suficiente para comparar de manera robusta los resultados obtenidos, lo que se tradujo en una debilidad para mostrar significancia en los experimentos realizados para este período, 5) el stock de MP2 a partir de la droga liofilizada y etanol puro, presenta un cierto grado de precipitación de la droga, que puede deberse a un decaimiento natural de la droga en el tiempo. Esto será estudiando prontamente en el laboratorio FCM, 6) Los anticuerpos primarios, utilizados en inmunofluorescencia de cortes histológicos, tenían una antigüedad mayor a 5 años y, el anticuerpo secundario marcaba indistintamente todas las regiones del corte. Por otro lado, entre las fortalezas de este trabajo encontramos que: 1) Los animales no se vieron afectados físicamente en términos de peso, pelaje o heridas aparentes, posterior al tratamiento con MP2, 2) Los resultados de las pruebas funcionales, análisis de patrón génico de distintos genes y actividad metabólica, muestran congruencia en los resultados posterior al tratamiento crónico con MP2, 3) La experiencia previa en la realización de pruebas

físicas permitió tomar decisiones de acuerdo al comportamiento de los animales y, modificar el protocolo para facilitar y ajustar la medición, 4) Los animales tuvieron una baja tasa de mortalidad durante todo el período de experimentación (fallecieron 3 ratones: 2 tratados con MP2 y 1 tratado con Salino), 5) Los protocolos de cada aproximación experimental fue aplicado de manera rigurosa y fue previamente consultando en los laboratorios que aplican cada técnica de manera regular, 6) Los experimentos de presión arterial fueron realizados en un laboratorio con amplia experiencia en la técnica, con el fin de obtener datos reproducibles y confiables, 7) el período que se contempló para las inyecciones de la droga o solución salina, se realizó de manera regular y continua durante 4-6 y 8-10 semanas, con el fin de mantener los niveles de MP2 en el organismo, 8) No se aplicó ningún estímulo complementario sobre los animales tratados con salino o MP2, con el fin de tener una relación directa de la acción de la droga sobre los resultados obtenidos.

ANEXO 1

HISTOQUÍMICA ENZIMÁTICA DE SDH: Figuras 1-5.

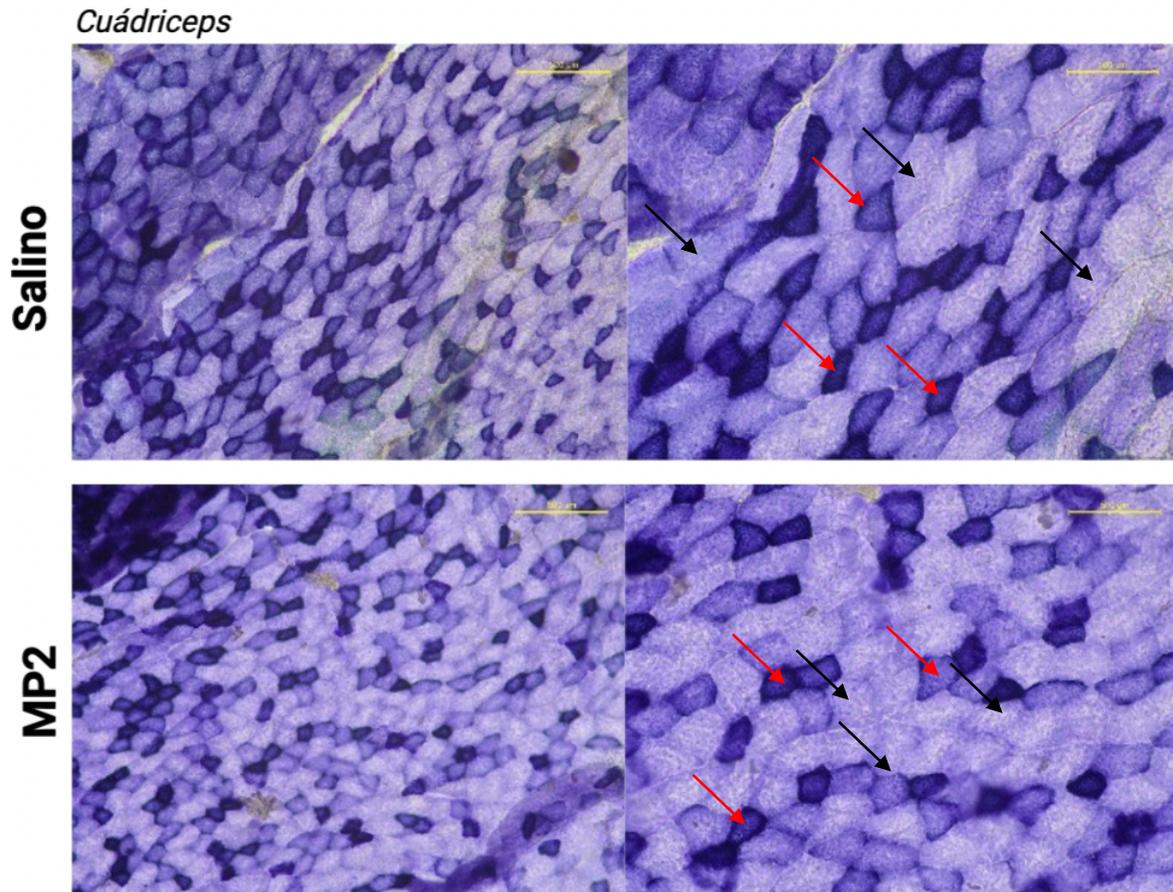


Figura 1. Efectos del suministro de MP2 o Solución Salina en la actividad enzimática de Succinato Deshidrogenasa (SDH) en cortes histológicos de Cuádriceps de ratones tratados entre 4 a 6 semanas con inyección I.P. Los cortes de cuádriceps (12 μ m) de los animales Salinos (n=4) y MP2 (n=4) que se muestran en la figura son una representación general de todos los cortes tratados y evaluados. El tiempo y temperatura de incubación de todos los cortes fue: 15 minutos a 37°C. Las flechas rojas indican las fibras con marca para actividad de SDH mientras que las flechas negras indican las fibras no marcadas, es decir, fibras que no presentaron actividad de SDH. Las imágenes que se muestran en el panel izquierdo están tomadas con un lente X y las imágenes de la derecha están tomadas con un lente 20x, que pertenecen al mismo músculo de un animal tratado con solución Salina y otro tratado con MP2.

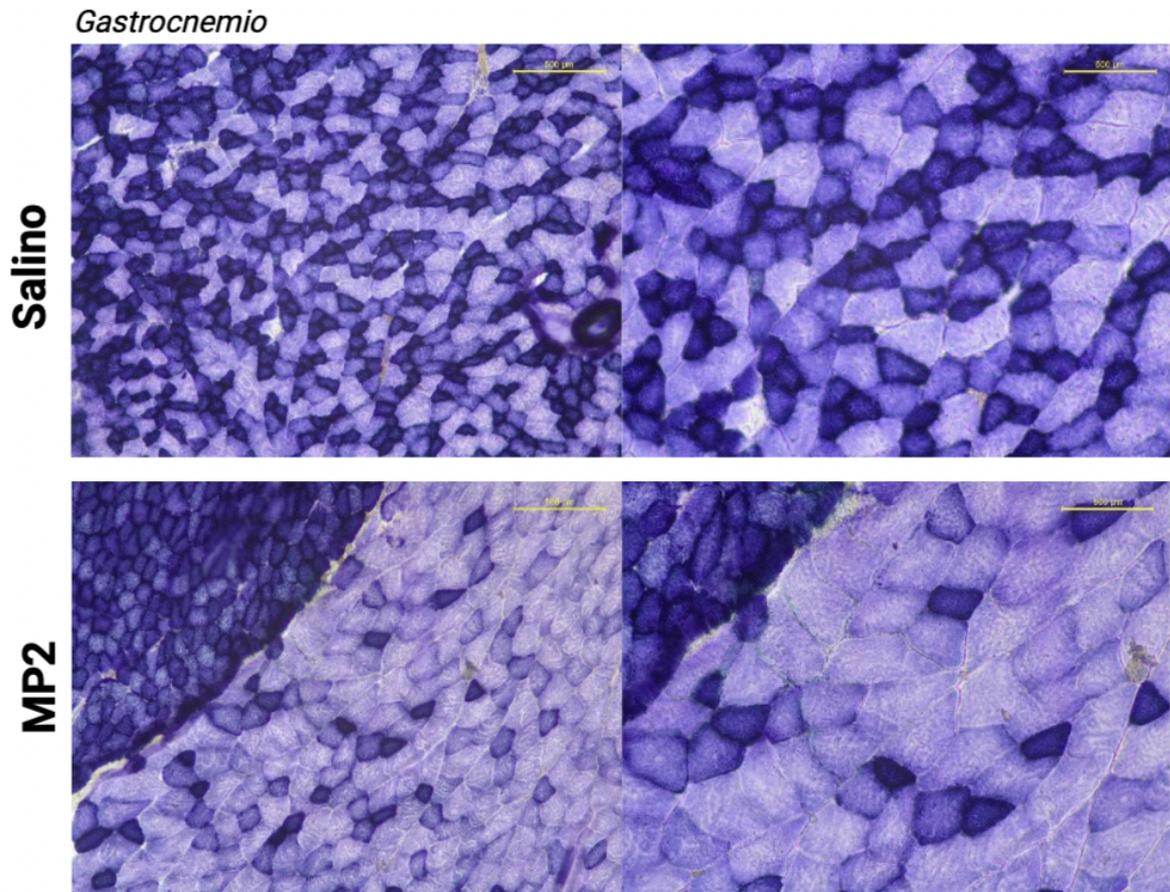


Figura 2. Efectos del suministro de MP2 o Solución Salina en la actividad enzimática de Succinato Deshidrogenasa (SDH) en cortes histológicos de Gastrocnemio de ratones tratados entre 4 a 6 semanas con inyección I.P. Los cortes de gastrocnemio (12 μ m) de los animales Salinos (n=4) y MP2 (n=4) que se muestran en la figura son una representación general de todos los cortes tratados y evaluados. El tiempo y temperatura de incubación de todos los cortes fue: 15 minutos a 37°C. Las flechas rojas indican las fibras con marca para actividad de SDH mientras que las flechas negras indican las fibras no marcadas, es decir, fibras que no presentaron actividad de SDH. Las imágenes que se muestran en el panel izquierdo están tomadas con un lente 10X y las imágenes de la derecha están tomadas con un lente 20x, que pertenecen al mismo músculo de un animal tratado con solución Salina y otro tratado con MP2.

Tibial Anterior

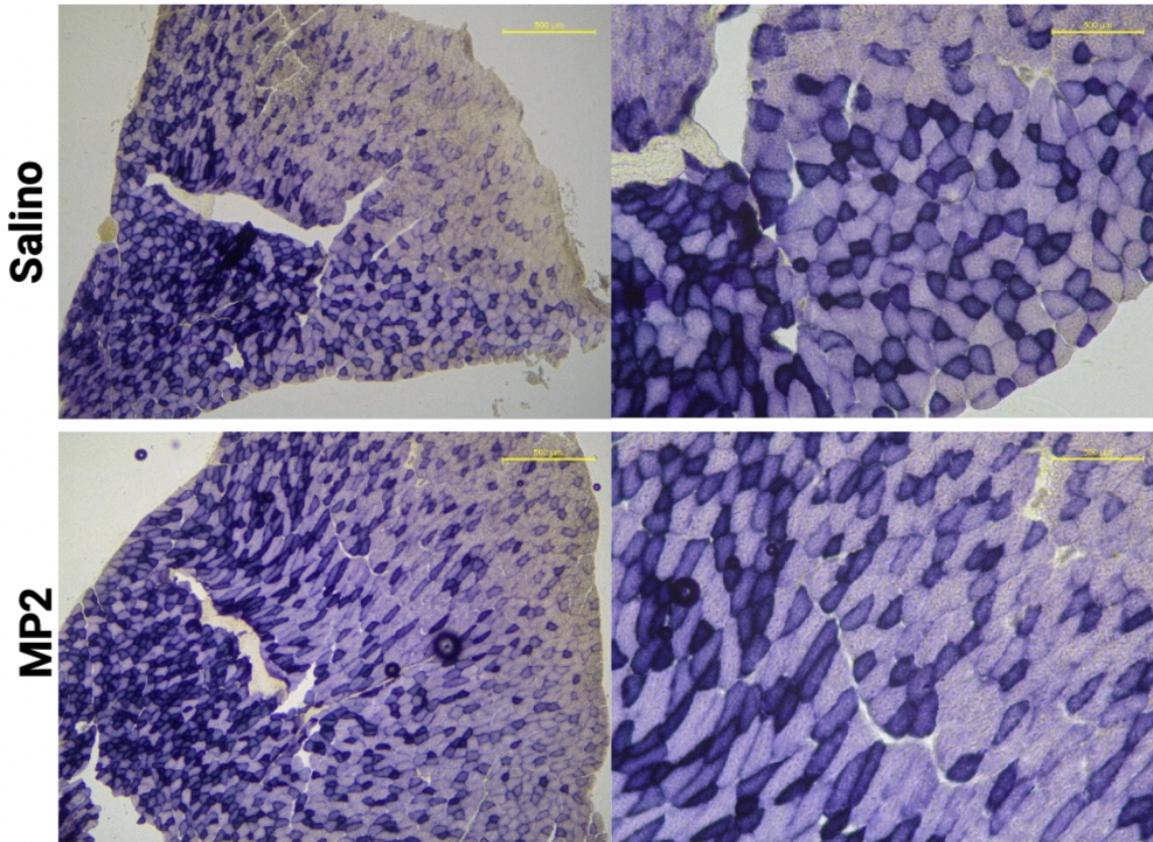


Figura 3. Efectos del suministro de MP2 o Solución Salina en la actividad enzimática de Succinato Deshidrogenasa (SDH) en cortes histológicos de Tibial Anterior de ratones tratados entre 4 a 6 semanas con inyección I.P. Los cortes de gastrocnemio (12 μ m) de los animales Salinos (n=4) y MP2 (n=4) que se muestran en la figura son una representación general de todos los cortes tratados y evaluados. El tiempo y temperatura de incubación de todos los cortes fue: 15 minutos a 37°C. Las flechas rojas indican las fibras con marca para actividad de SDH mientras que las flechas negras indican las fibras no marcadas, es decir, fibras que no presentaron actividad de SDH. Las imágenes que se muestran en el panel izquierdo están tomadas con un lente 10X y las imágenes de la derecha están tomadas con un lente 20x, que pertenecen al mismo músculo de un animal tratado con solución Salina y otro tratado con MP2.

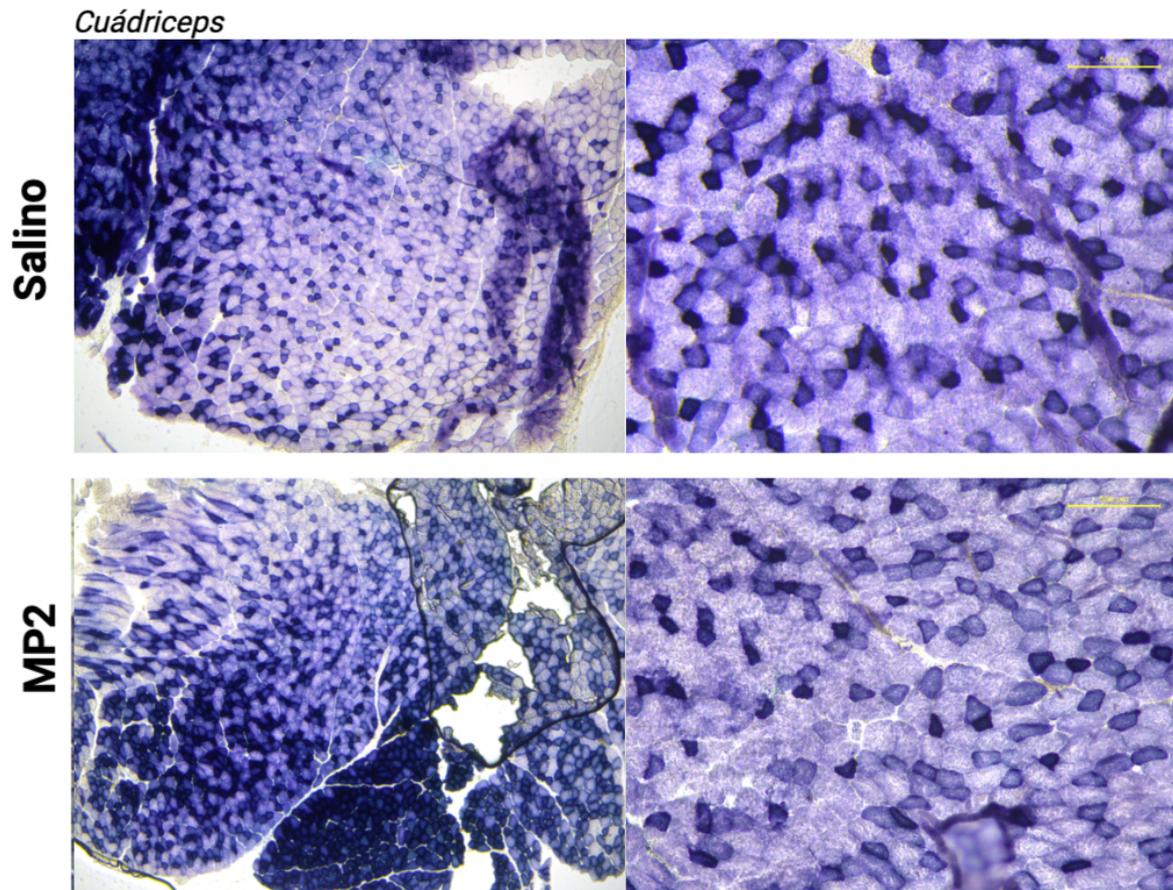


Figura 4. Efectos del suministro de MP2 o Solución Salina en la actividad enzimática de Succinato Deshidrogenasa (SDH) en cortes histológicos de Cuádriceps de ratones tratados entre 8 a 10 semanas con inyección I.P. Los cortes de cuádriceps (12 μ m) de los animales Salinos (n=5) y MP2 (n=5) que se muestran en la figura son una representación general de todos los cortes tratados y evaluados. El tiempo y temperatura de incubación de todos los cortes fue: 15 minutos a 37°C. Las flechas rojas indican las fibras con marca para actividad de SDH mientras que las flechas negras indican las fibras no marcadas, es decir, fibras que no presentaron actividad de SDH. Las imágenes que se muestran en el panel izquierdo están tomadas con un lente X y las imágenes de la derecha están tomadas con un lente 20x, que pertenecen al mismo músculo de un animal tratado con solución Salina y otro tratado con MP2.

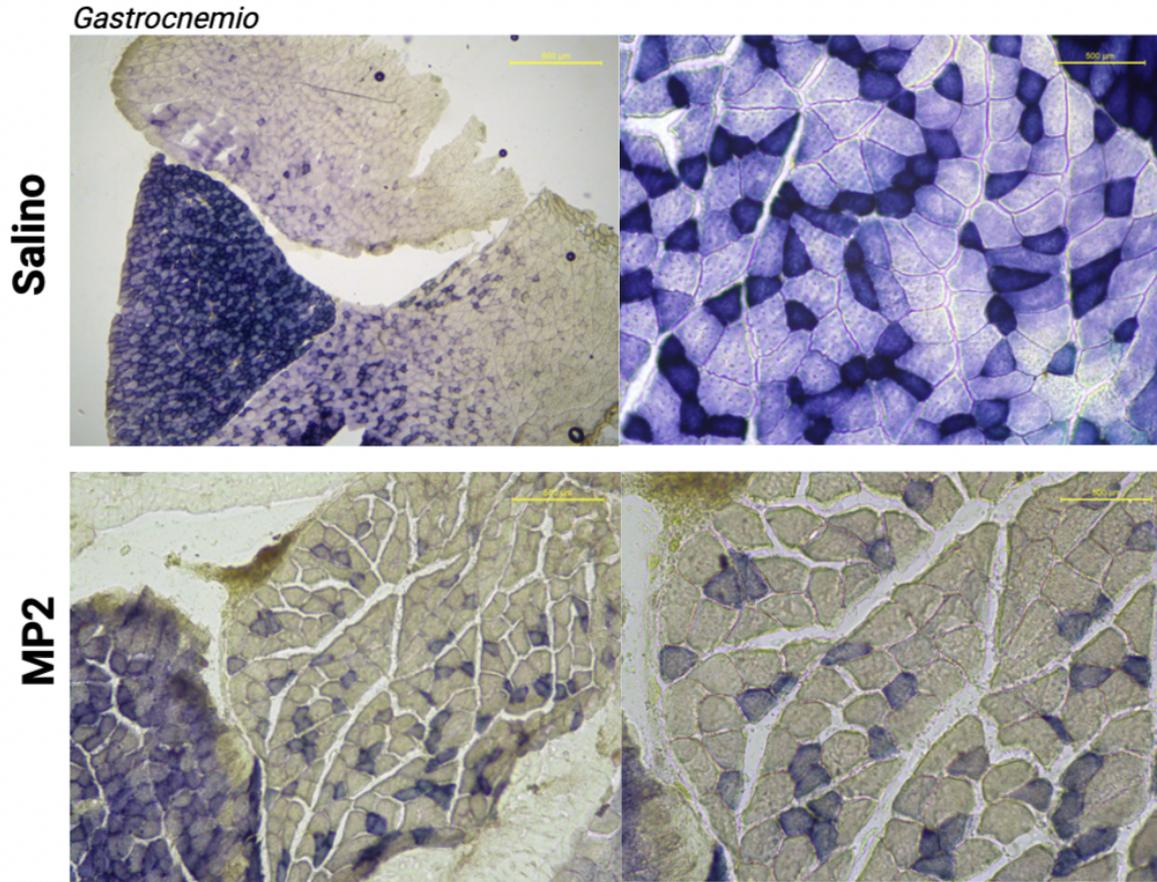


Figura 5. Efectos del suministro de MP2 o Solución Salina en la actividad enzimática de Succinato Deshidrogenasa (SDH) en cortes histológicos de Gastrocnemio de ratones tratados entre 8 a 10 semanas con inyección I.P. Los cortes de gastrocnemio ($12\mu\text{m}$) de los animales Salinos ($n=5$) y MP2 ($n=5$) que se muestran en la figura son una representación general de todos los cortes tratados y evaluados. El tiempo y temperatura de incubación de todos los cortes fue: 15 minutos a 37°C . Las flechas rojas indican las fibras con marca para actividad de SDH mientras que las flechas negras indican las fibras no marcadas, es decir, fibras que no presentaron actividad de SDH. Las imágenes que se muestran en el panel izquierdo están tomadas con un lente 10X y las imágenes de la derecha están tomadas con un lente 20x, que pertenecen al mismo músculo de un animal tratado con solución Salina y otro tratado con MP2.

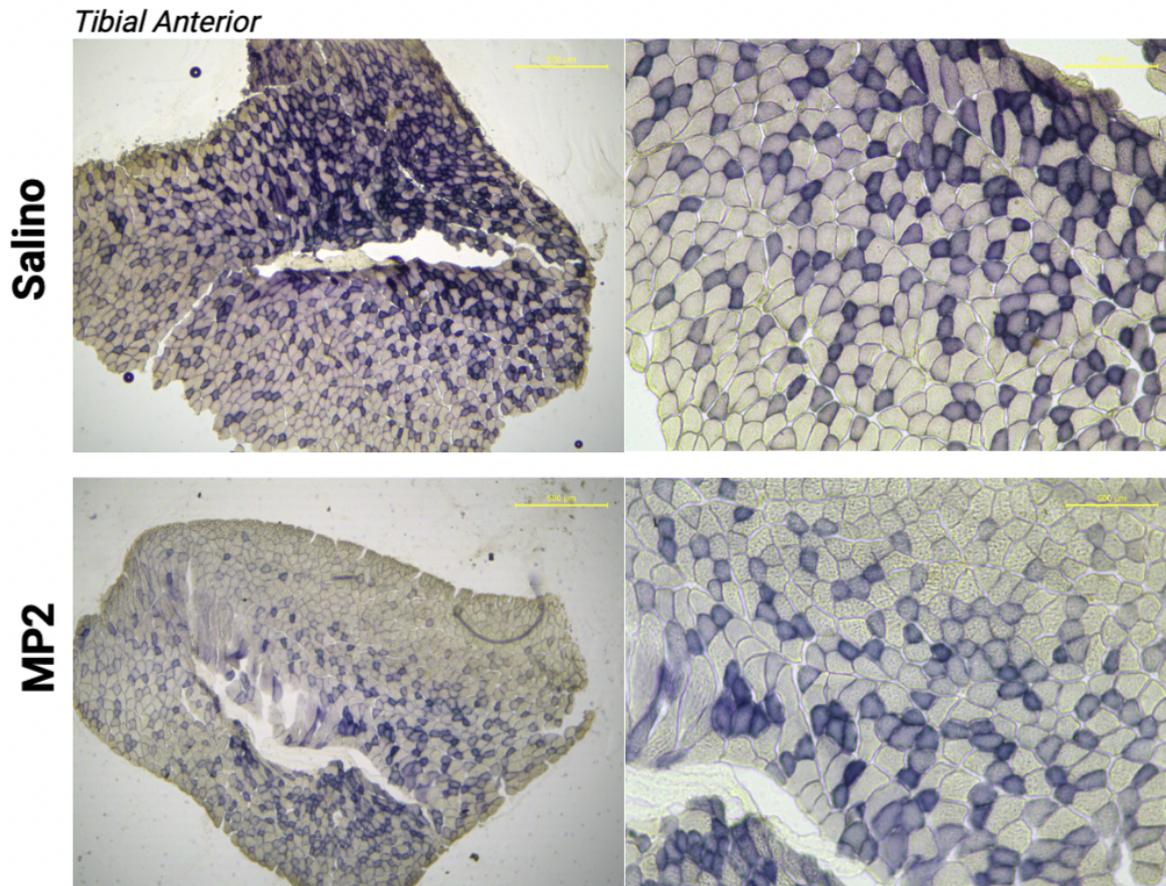


Figura 6. Efectos del suministro de MP2 o Solución Salina en la actividad enzimática de Succinato Deshidrogenasa (SDH) en cortes histológicos de Tibial Anterior de ratones tratados entre 8 a 10 semanas con inyección I.P. Los cortes de gastrocnemio (12 μ m) de los animales Salinos (n=5) y MP2 (n=5) que se muestran en la figura son una representación general de todos los cortes tratados y evaluados. El tiempo y temperatura de incubación de todos los cortes fue: 15 minutos a 37°C. Las flechas rojas indican las fibras con marca para actividad de SDH mientras que las flechas negras indican las fibras no marcadas, es decir, fibras que no presentaron actividad de SDH. Las imágenes que se muestran en el panel izquierdo están tomadas con un lente 10X y las imágenes de la derecha están tomadas con un lente 20x, que pertenecen al mismo músculo de un animal tratado con solución Salina y otro tratado con MP2.

ANEXO 2

INMUNOFLUORESCENCIA: Cadenas Pesadas de Miosina tipo I, IIa, IIb y IIx.

Con el fin de realizar otra aproximación experimental para responder a los objetivos de este trabajo, se realizaron tinciones de cortes histológicos (12 μm) de distintos músculos (Sóleo-Gastrocnemio, Cuádriceps y Tibial Anterior) de las extremidades inferiores de ratones adultos tratados durante 4 a 6 y 8 a 10 semanas con MP2 o Solución Salina, con la técnica de inmunofluorescencia. Para esto, se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales de Cadena Pesada de Miosina tipo I, IIa, IIb y IIx y un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti cabra. Luego de realizar las tinciones, se obtuvieron las fotos de los cortes con un microscopio confocal utilizando distintos lentes (20X, 40X y 60X). Al analizar las imágenes obtenidas de cada corte y cada anticuerpo, no fue posible distinguir de manera clara qué fibra marcaba para los diferentes anticuerpos. Tampoco fue posible eliminar la marca del secundario en la membrana de la fibra. Con el fin de entender la razón de por qué se marcaban indistintamente las fibras de los distintos músculos y distintos anticuerpos primarios, se realizaron controles sin anticuerpos primarios. Al analizar los controles y los cortes incubados con anticuerpos primarios, se pudo observar que las marcas son iguales en ambas condiciones y, por tanto, es posible que haya una falla en los anticuerpos primarios y/o secundarios. Es por esta razón que no se utilizaron estos experimentos para responder al objetivo específico 4. No obstante, se consideró que la histoquímica enzimática para SDH, por dar una marca clara y un resultado robusto, es suficiente para responder frente al cambio de fenotipo de fibra por tinción de cortes histológicos. Las figuras 1,2 y 3 muestran los cortes de Cuádriceps, Sóleo-Gastrocnemio y Tibial Anterior incubados con anticuerpo primario y secundario, y la figura 4 muestra los controles incubados sólo con anticuerpo secundario.

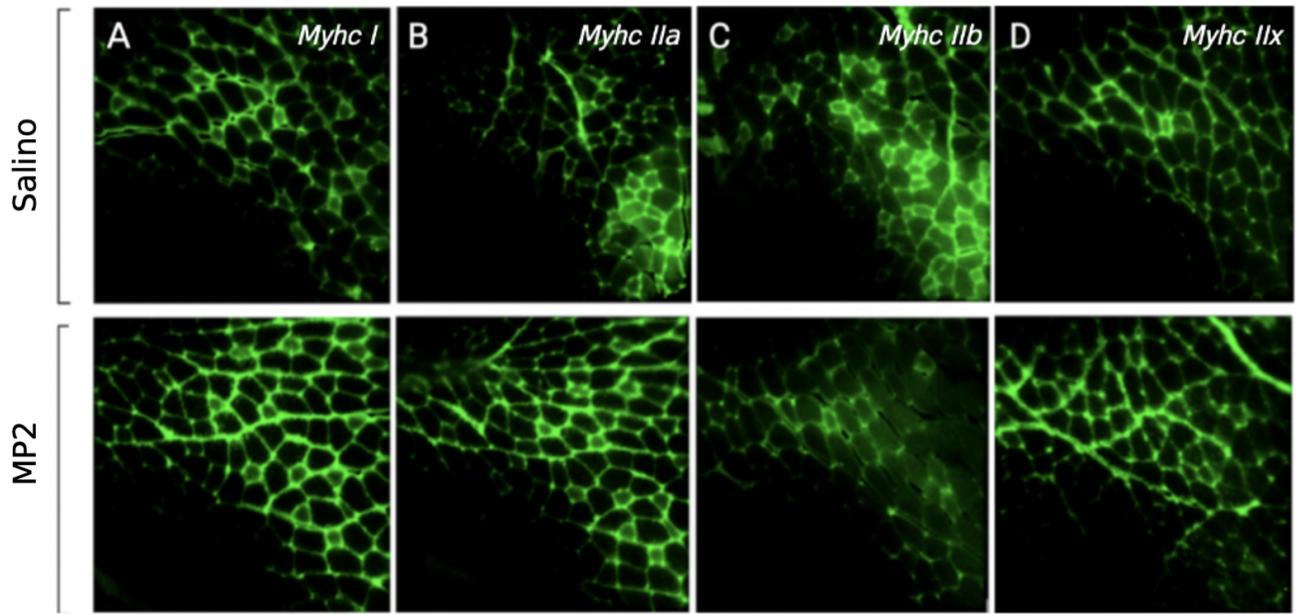


Figura 1. Inmunofluorescencia de Cadenas Pesadas de Miosina (I, IIa, IIb y IIx) de cortes histológicos (12 μm) del músculo Cuádriceps de ratones tratados con MP2 y Solución Salina (Control). A) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo I en músculo *CUA*, tratado con MP2 o Salino (control). B) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo IIa en músculo *CUA*, tratado con MP2 o Salino (control). C) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo IIb en músculo *CUA*, tratado con MP2 o Salino (control). D) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo IIx en músculo *CUA*, tratado con MP2 o Salino (control).

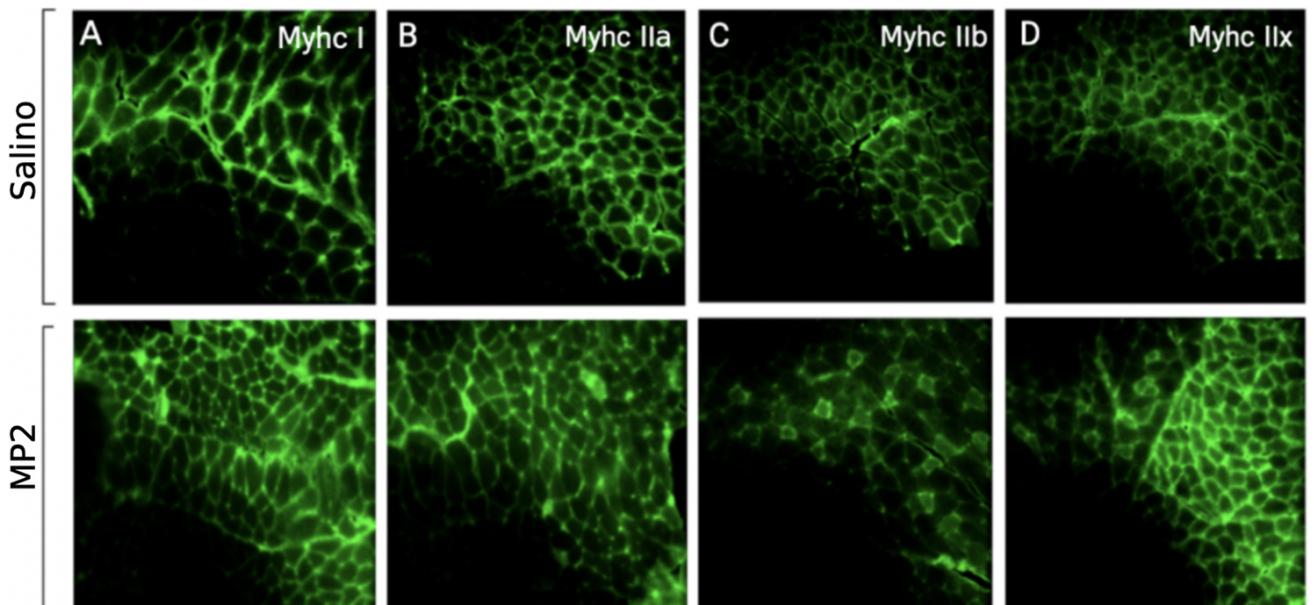


Figura 2. Inmunofluorescencia de Cadenas Pesadas de Miosina (I, IIa, IIb y IIx) de cortes histológicos (12 μm) del músculo Gastrocnemio de ratones tratados con MP2 y Solución Salina (Control). A) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo I en músculo GAS, tratado con MP2 o Salino (control). B) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo IIa en músculo GAS, tratado con MP2 o Salino (control). C) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo IIb en músculo GAS, tratado con MP2 o Salino (control). D) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo IIx en músculo GAS, tratado con MP2 o Salino (control).

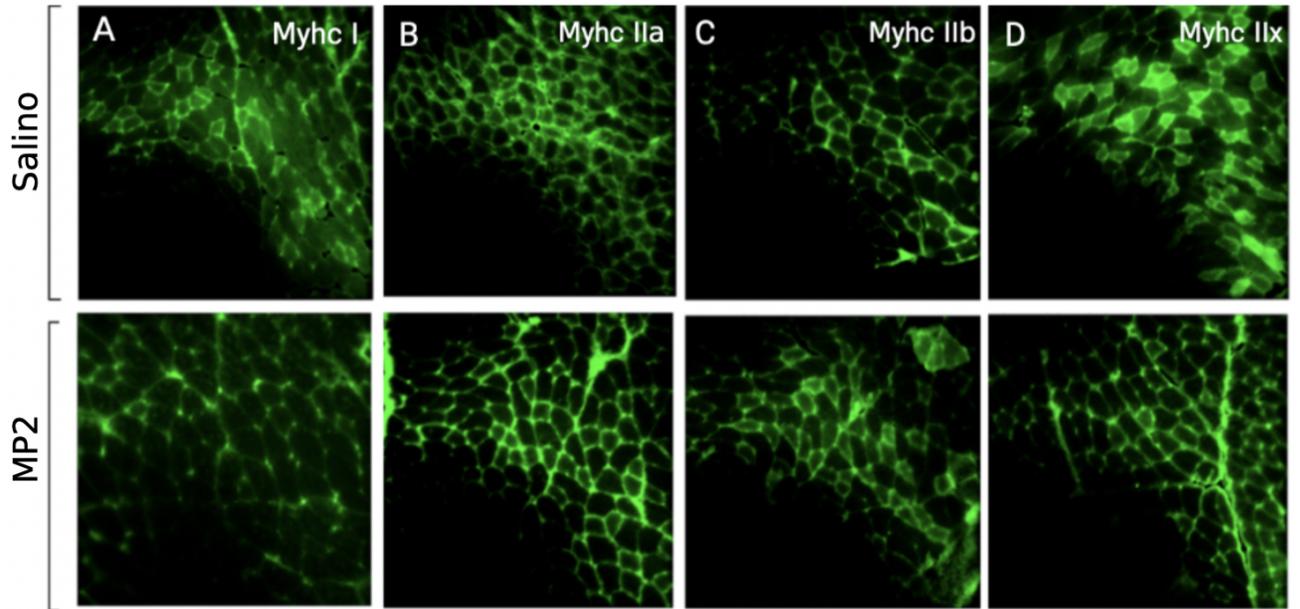


Figura 3. Inmunofluorescencia de Cadenas Pesadas de Miosina (I, IIa, IIb y IIx) de cortes histológicos (12 μm) del músculo Tibial Anterior de ratones tratados con MP2 y Solución Salina (Control). A) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo I en músculo TA, tratado con MP2 o Salino (control). B) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo IIa en músculo TA, tratado con MP2 o Salino (control). C) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo IIb en músculo TA, tratado con MP2 o Salino (control). D) Inmunofluorescencia de Cadena pesada de miosina tipo IIx en músculo TA, tratado con MP2 o Salino (control).

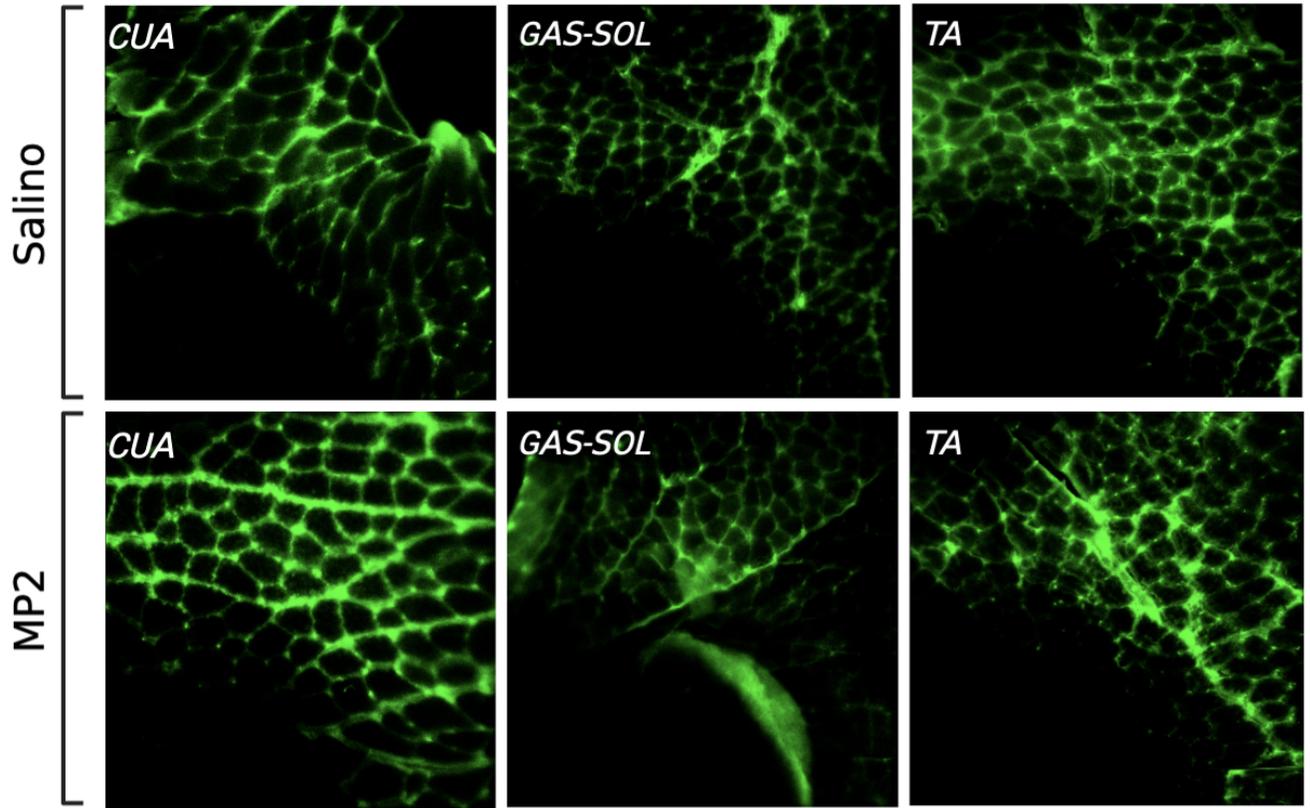


Figura 4. Cortes histológicos (12 μ m) de músculos Gastrocnemio, Cuádriceps y Tibial anterior incubados con anticuerpo secundario.

ANEXO 3

PRESIÓN ARTERIAL DE RATONES TRATADOS CON DROGA MP2 CRÓNICAMENTE.

	PRESIÓN SISTÓLICA (MM HG)	PRESIÓN DIASTÓLICA (MM HG)	PROMEDIO SISTÓLICA+DIASTÓLICA (MM HG)
CONTROL 1	103,2	78	86,11
CONTROL 2	102,4	80,4	87,3
MP2 1	102,4	87,6	92,2
MP2 2	101,1	76	84,1

Tabla 1. Presión Arterial de ratones tratados durante 8 a 10 semana (n=2). Respuesta del mecanismo Barorreflejo y Presión Arterial inducida por fármacos.

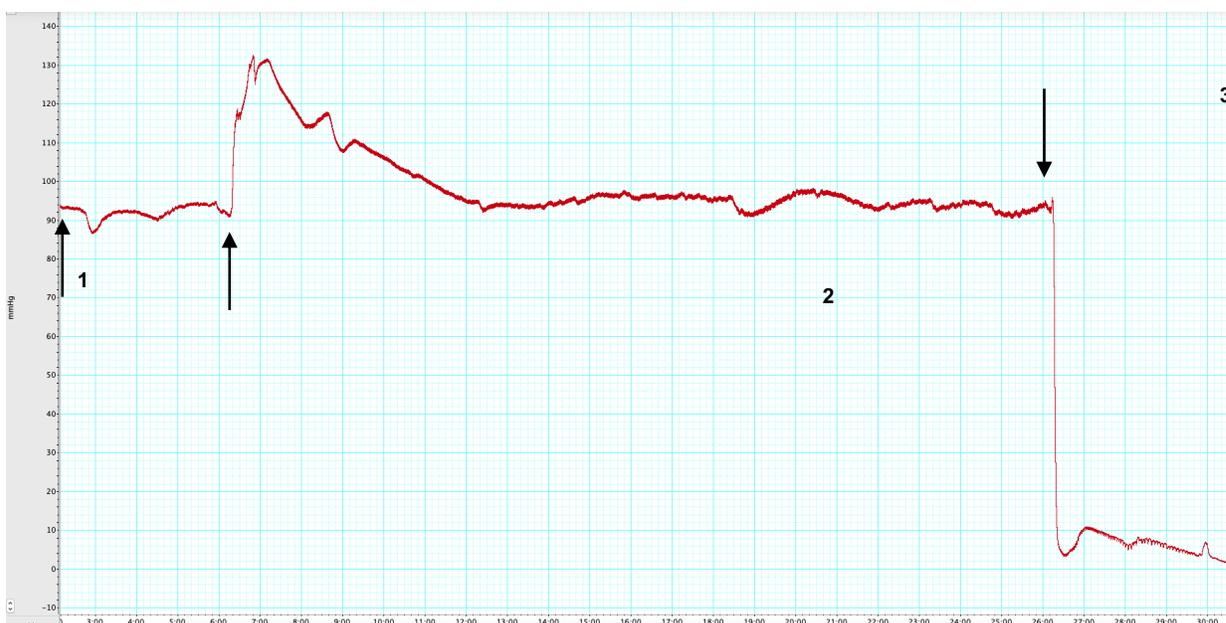


Figura 2. Variación de la Presión Arterial Media (PAM) inducida por fármacos. 1) Inyección intravenosa con MP2 (2mg/kg, 100uL). 2) Inyección intravenosa con fenilefrina (PE) (0,1mg/mL, 50uL). 3) Inyección intravenosa con nifedipino (2mg/kg, 100uL).

ANEXO 4

CURVA DE PESO ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON DROGA Y SOLUCIÓN SALINA.

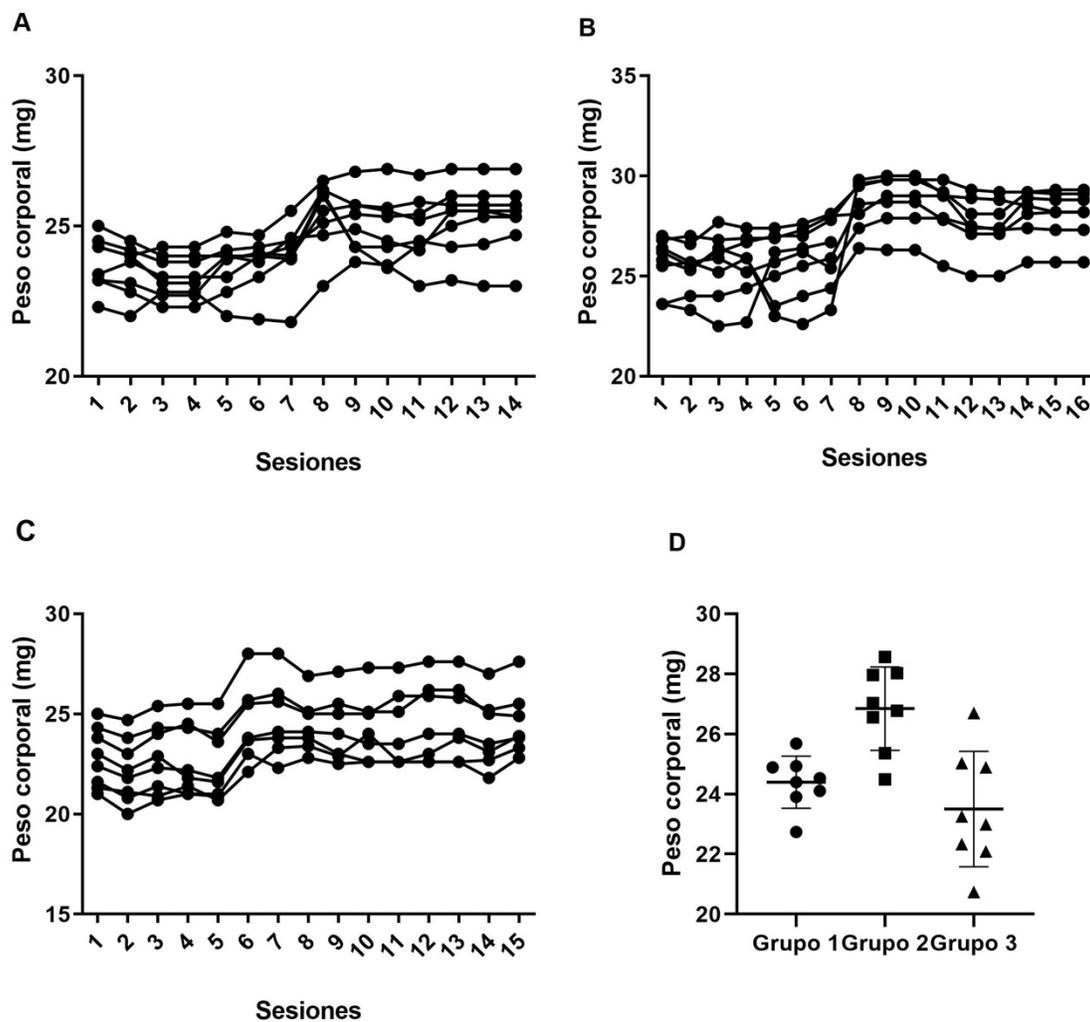


Figura 1. Curvas de peso antes y después del tratamiento intraperitoneal con MP2 y Solución Salina. a) Curva de peso del 1er grupo de animales tratados (4 a 6 y 8 a 10 semanas). b) Curva de peso del 2o grupo de animales tratados (4 a 6 y 8 a 10 semanas). c) Curva de peso del 3er grupo de animales tratados (4 a 6 y 8 a 10 semanas). d) Comparación del promedio (\pm SD) de pesos (mg) de los grupos 1,2 y 3 durante el período pre y post tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Aartsma-Rus, A., van Putten, M., De, S., Porte, L., Dubach-Powell, J., Carlson, G., & Physiology, D. (2008). *Use of grip strength meter to assess the limb strength of mdx mice SOP (ID) Number DMD_M.2.2.001 Version 2.0.*
- Altamirano, F., Valladares, D., Henríquez-Olguín, C., Casas, M., López, J. R., Allen, P. D., & Jaimovich, E. (2013). Nifedipine treatment reduces resting calcium concentration, oxidative and apoptotic gene expression, and improves muscle function in dystrophic mdx mice. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081222>
- American College of Sports Medicine by Nicholas A. Ratamess, Ph. D. ; B. A. A. Ph. D. ; T. K. E. Ph. D. , F. T. J. H. Ph. D. , F. (Chair); W. B. K. M. D. , F. W. J. K. Ph. D. , F. and N. T. T. Ph. D. (2009). Progression models in resistance training for healthy adults. In *Medicine and Science in Sports and Exercise Progression Models in Resistance Training for Healthy Adults, Medicine & Science in Sports & Exercise: March 2009 - Volume 41 - Issue 3 - p 687-708 doi: 10.1249/MSS.0b013e3181915670* (Vol. 41, Issue 3, pp. 687–708). <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181915670>
- Andersen, J. L., Gruschy-Knudsen, T., Sandri, C., Larsson, L., & Schiaffino, S. (1999). Bed rest increases the amount of mismatched fibers in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 86(2), 455–460. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.86.2.455>
- Araya, R., Liberona, J. L., Cárdenas, J. C., Riveros, N., Estrada, M., Powell, J. A., Carrasco, M. A., & Jaimovich, E. (2003a). Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP3R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. *Journal of General Physiology*, 121(1), 3–16. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028671>
- Araya, R., Liberona, J. L., Cárdenas, J. C., Riveros, N., Estrada, M., Powell, J. A., Carrasco, M. A., & Jaimovich, E. (2003b). Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP3R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. *Journal of General Physiology*, 121(1), 3–16. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028671>
- Ausoni, S., Gorza, L., Schiaffino, S., Gundersen, K., & Lomo, T. (1990). Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *Journal of Neuroscience*, 10(1), 153–160. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-01-00153.1990>

- Blaauw, B., Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2013a). Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Comprehensive Physiology*, 3(4), 1645–1687.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c130009>
- Blaauw, B., Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2013b). *Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Phenotype Muscle Fiber Heterogeneity : Fiber*. 3(October), 1645–1687.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c130009>
- Boncompagni, S., D'amelio, L., Fulle, S., Fanò, G., & Protasi, F. (2006). *Progressive Disorganization of the Excitation-Contraction Coupling Apparatus in Aging Human Skeletal Muscle as Revealed by Electron Microscopy: A Possible Role in the Decline of Muscle Performance*. <https://academic.oup.com/biomedgerontology/article/61/10/995/600485>
- Brotto, M. A., Biesiadecki, B. J., Brotto, L. S., Nosek, T. M., & Jin, J. P. (2006). Coupled expression of troponin T and troponin I isoforms in single skeletal muscle fibers correlates with contractility. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 290(2).
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00422.2005>
- Buvinic, S., Almarza, G., Bustamante, M., Casas, M., López, J., Riquelme, M., Sáez, J. C., Huidobro-Toro, J. P., & Jaimovich, E. (2009). ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34490–34505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.057315>
- Caiozzo, V. J., Baker, M. J., & Baldwin, K. M. (1998). Novel transitions in MHC isoforms: Separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *Journal of Applied Physiology*, 85(6), 2237–2248. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.6.2237>
- Caiozzo, V. J., Haddad, F., Baker, M., Mccue, S., & Baldwin, K. M. (2000). MHC polymorphism in rodent plantaris muscle: Effects of mechanical overload and hypothyroidism. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 278(4 47-4), 709–717.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.4.c709>
- Calvo, S., Stauffer, J., Nakayama, M., & Buonanno, A. (1996). *Transcriptional Control of Muscle Plasticity: Differential Regulation of Troponin I Genes by Electrical Activity*.
- Carrell, E. M., Coppola, A. R., McBride, H. J., & Dirksen, R. T. (2016). Orai1 enhances muscle endurance by promoting fatigue-resistant type I fiber content but not through acute store-operated Ca²⁺ entry. *FASEB Journal*, 30(12), 4109–4119.
<https://doi.org/10.1096/fj.201600621R>

- Casas, M., Figueroa, R., Jorquera, G., Escobar, M., Molgó, J., & Jaimovich, E. (2010). IP3-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *Journal of General Physiology*, 136(4), 455–467.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200910397>
- Close, B. Y. R. (1967). *PROPERTIES OF MOTOR UNITS IN FAST AND SLOW SKELETAL MUSCLES OF THE RAT BY R. CLOSE* From the Department of Physiology , Australian National 1 . Three kinds of motor unit have been distinguished in soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL) muscl. 45–55.
- Close, B. Y. R. (1969). *DYNAMIC PROPERTIES OF FAST AND SLOW SKELETAL MUSCLES OF THE RAT AFTER NERVE CROSS-UNION*. 331–346.
- Damianil, E., Larsson², L., & Margreth', A. (1996). Age-related abnormalities in regulation of the ryanodine receptor in rat fast-twitch muscle. In *Research Cell Calcium*.
- de Matteis, A., dell'Aquila, M., Maiese, A., Frati, P., la Russa, R., Bolino, G., & Fineschi, V. (2019). The Troponin-I fast skeletal muscle is reliable marker for the determination of vitality in the suicide hanging. *Forensic Science International*, 301, 284–288.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.055>
- Deacon, R. M. J. (2013). Measuring the strength of mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 76. <https://doi.org/10.3791/2610>
- Delbono, O., O'rouke, K. S., & Ettinger, W. H. (1995). Membrane Biology Excitation-Calcium Release Uncoupling in Aged Single Human Skeletal Muscle Fibers. In *J. Membrane Biol* (Vol. 148).
- DeNardi, C., Ausoni, S., Moretti, P., Gorza, L., Velleca, M., Buckingham, M., & Schiaffino, S. (1993). Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *Journal of Cell Biology*, 123(4), 823–835.
<https://doi.org/10.1083/jcb.123.4.823>
- Estrada, M., Cárdenas, C., Liberona, J. L., Carrasco, M. A., Mignery, G. A., Allen, P. D., & Jaimovich, E. (2001a). Calcium Transients in 1B5 Myotubes Lacking Ryanodine Receptors Are Related to Inositol Trisphosphate Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22868–22874. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100118200>

- Estrada, M., Cárdenas, C., Liberona, J. L., Carrasco, M. A., Mignery, G. A., Allen, P. D., & Jaimovich, E. (2001b). Calcium Transients in 1B5 Myotubes Lacking Ryanodine Receptors Are Related to Inositol Trisphosphate Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22868–22874. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100118200>
- Flück, M. (2006). Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 209, Issue 12, pp. 2239–2248). <https://doi.org/10.1242/jeb.02149>
- Fulle, S., Protasi, F., di Tano, G., Pietrangelo, T., Beltramin, A., Boncompagni, S., Vecchiet, L., & Fanò, G. (2004). The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Experimental Gerontology*, 39(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.09.012>
- Graber, T. G., Fandrey, K. R., & Thompson, L. D. v. (2019). Novel individualized power training protocol preserves physical function in adult and older mice. *GeroScience*, 41(2), 165–183. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00069-z>
- Graber, T. G., Ferguson-Stegall, L., Kim, J. H., & Thompson, L. D. v. (2013). C57BL/6 neuromuscular healthspan scoring system. In *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* (Vol. 68, Issue 11, pp. 1326–1336). <https://doi.org/10.1093/gerona/glt032>
- Graber, T. G., Maroto, R., Fry, C. S., Brightwell, C. R., & Rasmussen, B. B. (2021). Measuring Exercise Capacity and Physical Function in Adult and Older Mice. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 76(5), 819–824. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa205>
- Hendrickse, P. W., Krusnauskas, R., Hodson-Tole, E., Venckunas, T., & Degens, H. (2020). Endurance exercise plus overload induces fatigue resistance and similar hypertrophy in mice irrespective of muscle mass. *Experimental Physiology*, 105(12), 2110–2122. <https://doi.org/10.1113/EP089096>
- Hernández-Ochoa, E. O., & Schneider, M. F. (2018). Voltage sensing mechanism in skeletal muscle excitation-contraction coupling: Coming of age or midlife crisis? In *Skeletal Muscle* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13395-018-0167-9>
- Jorquera, G., Altamirano, F., Contreras-Ferrat, A., Almarza, G., Buvinic, S., Jacquemond, V., Jaimovich, E., & Casas, M. (2013). Cav1.1 controls frequency-dependent events

regulating adult skeletal muscle plasticity. *Journal of Cell Science*, 126(5), 1189–1198.
<https://doi.org/10.1242/jcs.116855>

Kirschbaum, B. J., Kucher, H. B., Termin, A., Kelly, A. M., & Pette, D. (1990). Antagonistic effects of chronic low frequency stimulation and thyroid hormone on myosin expression in rat fast-twitch muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 265(23), 13974–13980.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)77444-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)77444-9)

Klitgaard, H., Bergman, O., Betto, R., Salvati, G., Schiaffino, S., Clausen, T., & Saltin, B. (1990). Co-existence of myosin heavy chain I and IIa isoforms in human skeletal muscle fibres with endurance training. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 416(4), 470–472. <https://doi.org/10.1007/BF00370757>

L. Larsson. (n.d.). *The age-related motor disability: underlying mechanisms in skeletal muscle at the motor unit, cellular and molecular level.*

Ladora V Thompson. (1994). *Effects of Age and Training on Skeletal Muscle Physiology and Performance.*

Luff, A. R. (n.d.). *Age-associated Changes in the Innervation of Muscle Fibers and Changes in the Mechanical Properties of Motor Units.*

Maier, A., Gorza, L., Schiaffino, S., & Pette, D. (1988). A combined histochemical and immunohistochemical study on the dynamics of fast-to-slow fiber transformation in chronically stimulated rabbit muscle. *Cell and Tissue Research*, 254(1), 59–68.
<https://doi.org/10.1007/BF00220017>

Narayanan, N., Jones, D. L., Xu, A., Yu, J. C., & Effects, J. C. Y. (n.d.). *Effects of aging on sarcoplasmic reticulum function and contraction duration in skeletal muscles of the rat.*
www.physiology.org/journal/ajpcell

Newlands, S., Levitt, L. K., Robinson, C. S., Karpf, A. B. C., Hodgson, V. R. M., Wade, R. P., & Hardeman, E. C. (1998). Transcription occurs in pulses in muscle fibers. *Genes and Development*, 12(17), 2748–2758. <https://doi.org/10.1101/gad.12.17.2748>

Patterson, M. F., Stephenson, G. M. M., & Stephenson, D. G. (2006). Denervation produces different single fiber phenotypes in fast- and slow-twitch hindlimb muscles of the rat. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 291(3), 518–529.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00013.2006>

- Pette, D., & Vrbovn, G. (n.d.). Adaptation of Mammalian Skeletal Muscle Fibers to Chronic Electrical Stimulation. In *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* (Vol. 120).
- Proctor, D. N., Balagopal, P., & Nair, K. S. (1998). Symposium: The Roles of Nutrition, Development and Hormone Sensitivity in the Regulation of Protein Metabolism Age-Related Sarcopenia in Humans Is Associated with Reduced Synthetic Rates of Specific Muscle Proteins 1,2. In *J. Nutr* (Vol. 128).
<https://academic.oup.com/jn/article/128/2/351S/4723992>
- Qaisar, R., Bhaskaran, S., & van Remmen, H. (2016). Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 98, 56–67.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025>
- Quezada, E. R., Díaz-Vegas, A., Jaimovich, E., & Casas, M. (2021). Changes in Gene Expression of the MCU Complex Are Induced by Electrical Stimulation in Adult Skeletal Muscle. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.601313>
- Renganathan, M., Messi, M. L., & Delbono, O. (n.d.). *Dihydropyridine Receptor-Ryanodine Receptor Uncoupling in Aged Skeletal Muscle*.
- Schiaffino, S. (2018). Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies. In *FEBS Journal* (Vol. 285, Issue 20, pp. 3688–3694). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/febs.14502>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance. *Physiological Reviews*, 76(2), 371–423.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.2.371>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber Types In Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol Rev*, 91, 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010.-Mammalian>
- Seldeen, K. L., Lasky, G., Leiker, M. M., Pang, M., Personius, K. E., & Troen, B. R. (2018). High Intensity Interval Training Improves Physical Performance and Frailty in Aged Mice. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 73(4), 429–437. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx120>
- Shoji, H., & Miyakawa, T. (2019). Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharmacology Reports*, 39(2), 100–118. <https://doi.org/10.1002/npr2.12052>

- Tavi, P., & Westerblad, H. (2011). The role of in vivo Ca²⁺ signals acting on Ca²⁺-calmodulin-dependent proteins for skeletal muscle plasticity. In *Journal of Physiology* (Vol. 589, Issue 21, pp. 5021–5031). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.212860>
- Termin A, Staron RS, & Pette D. (1989). Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry*, 92, 453–457.
- Valladares, D., Almarza, G., Contreras, A., Pavez, M., Buvinic, S., Jaimovich, E., & Casas, M. (2013). Electrical stimuli are anti-apoptotic in skeletal muscle via extracellular ATP. Alteration of this signal in Mdx mice is a likely cause of dystrophy. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075340>
- van Wessel, T., de Haan, A., van der Laarse, W. J., & Jaspers, R. T. (2010). The muscle fiber type-fiber size paradox: Hypertrophy or oxidative metabolism? *European Journal of Applied Physiology*, 110(4), 665–694. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1545-0>
- Vandervoort, A. A. (2002). Aging of the human neuromuscular system. In *Muscle and Nerve* (Vol. 25, Issue 1, pp. 17–25).
- Wu, J., Yan, N., & Yan, Z. (2017). Structure-function relationship of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 981, pp. 23–39). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55858-5_2

