



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ Y $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ EN LA
RESISTENCIA A LA FATIGA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
RATAS DIABÉTICAS**

TESIS

que presenta:

BIOL. JOSÉ JESÚS URINCHO CASTRO

para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

ASESOR DE TESIS: D. en C. Salvador Manzo Ávalos

CO-ASESORA DE TESIS: D. en C. Rocío del Carmen Montoya Pérez.

MORELIA, MICHOACÁN. FEBRERO 2016.

ÍNDICE

Página

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades del músculo.....	1
1.1.1 Músculo liso.....	1
1.1.2 Músculo estriado.....	2
1.2 Estructura del músculo esquelético.....	3
1.3 Tipos de filamentos.....	7
1.4 Clasificación de las fibras esqueléticas.....	8
1.5 Teoría del deslizamiento de los filamentos.....	11
II. ANTECEDENTES	13
2.1 La diabetes mellitus.....	13
2.2 Clasificación de la diabetes mellitus.....	15
2.2.1 Diabetes tipo I.....	15
2.2.2 Diabetes tipo 2.....	18
2.3 Complicaciones clínicas de la diabetes mellitus.....	20
2.4 La fatiga muscular.....	22
2.5 Los canales de K ⁺ sensibles a ATP.....	23
2.6 Estructura de los canales de K ⁺ sensibles a ATP	28
2.6.1 Subunidades k _{ir} 6.x.....	29
2.6.2 Subunidades SUR.....	30
2.7 Los canales de K ⁺ sensibles a ATP mitocondriales.....	31
2.8 Composición molecular de los canales K _{ATP} mitocondriales.....	31

2.9 Regulación farmacológica de los canales K_{ATP}	32
2.10 Papel de los canales K_{ATP} durante la fatiga.....	34
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
IV. HIPÓTESIS.....	38
V. OBJETIVO GENERAL.....	38
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....	39
VII. METODOLOGÍA.....	39
7.1 Material biológico.....	39
7.2 Disección del músculo.....	39
7.3 Protocolo de estimulación de los músculos.....	40
7.4 Protocolos de aislamiento de mitocondrias.....	41
7.5 Purificación de mitocondrias.....	43
7.6 Determinación de la concentración de proteína.....	43
7.7 Western blot.....	44
7.7.1 Electroforesis de proteínas.....	44
7.7.2 Transferencia de proteínas.....	45
7.8 Inmunodetección.....	45
7.8.1 Incubación con anticuerpos.....	45
VIII. RESULTADOS.....	47
8.1 Registros de tensión isométrica.....	48
8.1.1 Efecto de la Glibenclamida y del Pinacidil sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de rata.....	50
8.1.2 Efecto de la diabetes sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas.....	52

8.1.3 Efecto del tratamiento de la diabetes con insulina sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas.....	54
8.1.4 Efecto de la administración prolongada del nicorandil sobre la tensión de las fibras lentas del músculo esquelético.....	56
8.2 Inmunodetección de las subunidades de los canales K_{ATP}	58
8.2.1 Subunidad Kir6.2.....	59
8.2.2 Subunidad Kir6.1.....	62
IX. DISCUSIÓN.....	65
X. CONCLUSIÓN.....	75
XI. REFERENCIAS.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	Página
Figura 1. Los tres tipos de músculos presentes en vertebrados y su aspecto bajo el microscopio.....	4
Figura 2. Estructura y niveles de organización del músculo esquelético.....	5
Figura 3. Estructura de las triadas formadas por los Túbulos T y retículos sarcoplasmático.....	6
Figura 4. El Sarcómero en estado de relajación y el sarcómero acortado por contracción muscular.....	11
Figura 5. Estimación de la incidencia de DM en la población mundial.....	13
Figura 6. Principales países con el mayor número de individuos con DM.....	14
Figura 7. Estructura del canal K_{ATP} y las subunidades que lo conforman.....	29
Tabla 1. Selectividad de los abridores e inhibidores de los canales $mitoK_{ATP}$, $sarcoK_{ATP}$	34
Figura 8. Posible mecanismo de participación del canal $sarcoK_{ATP}$ en el músculo esquelético.....	35
Figura 9. Las rutas de señalización intramitocondrial en la activación del $mitoK_{ATP}$	37
Figura 10. Niveles de glucosa sanguínea en los diferentes grupos de ratas.....	47
Figura 11. Peso de los diferentes grupos de ratas.....	48
Figura 12. Tiempo de establecimiento de la fatiga muscular en los diferentes grupos.....	49
Figura 13. Efecto de la glibenclamida sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas control.....	51

Figura 14. Efecto del pinacidil sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas control.....	51
Figura 15. Efecto de la diabetes sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas.....	53
Figura 16. Efecto de la diabetes sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas.....	53
Figura 17. Efecto de la glibenclamida sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas diabéticas tratadas con insulina.....	55
Figura 18. Efecto del pinacidil sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas diabéticas tratadas con insulina.....	55
Figura 19. Efecto de la glibenclamida sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas diabéticas tratadas con nicorandil.....	57
Figura 20. Efecto del pinacidil sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas diabéticas tratadas con nicorandil.....	57
Figura 21. Prueba de especificidad de anticuerpo.....	58
Figura 22. Inmunodetección de la subunidad Kir6.2 en homogenados totales.....	60
Figura 23. Inmunodetección de la subunidad Kir6.2 en fracción mitocondrial.....	61
Figura 24. Inmunodetección de la subunidad Kir6.1 en homogenados totales....	63
Figura 25. Inmunodetección de la subunidad Kir6.1 en fracción mitocondrial.....	64

RESUMEN

En la actualidad el número de personas con enfermedades crónicas degenerativas va en aumento debido al tipo de vida sedentario que poseemos, la mala alimentación y la predisposición genética. La diabetes mellitus (DM) es considerada ya una epidemia a nivel mundial (López-Izquierdo *et al.*, 2014). Los pacientes con diabetes desarrollan grandes riesgos de padecer enfermedades cardiovasculares, neuropatía y miopatía entre muchas otras enfermedades en lo que se denominan enfermedades sistémicas. Uno de los síntomas que son constantemente referidos por los pacientes es la fatiga. La fatiga muscular es la disminución de la fuerza evidenciada como una disminución de la amplitud de la contracción y del rendimiento muscular después de periodos de intensa actividad (Allen y Trajanovska, 2012). Es claro que al no contar con la energía suficiente el sistema músculo-esquelético se verá disminuido en sus posibilidades de movimiento. Se ha documentado que los canales de potasio sensible a ATP (K_{ATP}) tanto de membrana sarcolemal como de membrana mitocondrial juegan un papel importante en la protección del músculo durante la fatiga. Existen varios reportes sobre los efectos que tiene la diabetes sobre la fisiología del músculo, reflejándose como atrofia, debilidad y una incrementada susceptibilidad a la fatiga (Andersen, 2012).

En el presente trabajo abordamos las afectaciones producidas por la DM en un modelo de diabetes tipo 1 (inducida por administración de estreptozotocina vía intraperitoneal) sobre la función contráctil del músculo esquelético, evaluando alteraciones tanto en el funcionamiento de los canales K_{ATP} , así como en los niveles proteicos de las subunidades que constituyen a estos. De igual modo, se evaluó si el tratamiento de la DM con insulina y nicorandil (activador específico de los canales $mitoK_{ATP}$), contrarrestaba las alteraciones producidas debido a la DM sobre los canales K_{ATP} . Los datos obtenidos mostraron que la DM posiblemente afecta el funcionamiento adecuado de los canales K_{ATP} (no hubo recuperación de la tensión post-fatiga en presencia de bloqueadores y abridores de dichos canales en grupo diabéticos sin tratamiento respecto al grupo control) y que el tratamiento de la DM con insulina conserva el buen estado funcional de dichos canales (sí se observó recuperación de la tensión cuando se bloquearon los canales $sarcoK_{ATP}$), también se pudo observar que el tratamiento con nicorandil permite conservar el adecuado funcionamiento de los canales K_{ATP} y por lo tanto de la contracción muscular. Por otra parte, en lo que respecta a los niveles proteicos de los canales K_{ATP} , el tratamiento con insulina restauró los niveles de la subunidad Kir6.2 tanto de los canales $sarcoK_{ATP}$ como de los $mitoK_{ATP}$, así como también que el nicorandil incrementa los niveles de la subunidad Kir6.1 en los canales $mitoK_{ATP}$.

ABSTRAC

At present the number of people with chronic degenerative diseases is increasing due to sedentary lifestyle we have, poor diet and genetic predisposition. Diabetes mellitus (DM) is already considered a worldwide epidemic (López-Izquierdo et al., 2014). Patients with diabetes develop a high risk of cardiovascular disease, neuropathy and myopathy among many other diseases in what are called systemic diseases. One of the symptoms that are constantly reported by patients is fatigue. Muscle fatigue is decreased strength evidenced as a decrease in amplitude of contraction and muscle performance after periods of intense activity (Allen and Trajanovska, 2012). It is clear that by not having enough energy the musculoskeletal system will be diminished in its possibilities of movement. It documented to channels potassium ATP-sensitive (K_{ATP}) sarcolemmal membrane as both mitochondrial membrane plays an important role in protecting muscle during fatigue. There are several reports on the effects of diabetes on muscle physiology, reflecting atrophy, weakness and increased susceptibility to fatigue (Andersen, 2012).

In this paper we address the effects produced by the DM in a model of type 1 diabetes (induced ministration of streptozotocin intraperitoneally) on the contractile function of skeletal muscle, evaluating changes both in the operation of K_{ATP} channels as well as in the protein levels of the subunits which constitute these. Similarly, we assessed whether the treatment of DM with insulin and nicorandil (specific activator of $mitoK_{ATP}$ channels), counteracted the alterations produced due to the DM on K_{ATP} channels. The data obtained showed that DM may affect the proper functioning of K_{ATP} channels (there was no recovery of the post-fatigue stress in the presence of blockers and openers of these channels in diabetic untreated group respect to control group) and treatment DM with insulin retains good functional status of those channels (yes voltage recovery was observed when $sarcoK_{ATP}$ channels were blocked), could also be observed that treatment with nicorandil preserves the proper functioning of the K_{ATP} channels and therefore muscle contraction. Moreover, in regard to the protein levels of K_{ATP} channels, insulin treatment restored levels of Kir6.2 subunit channels both as the $sarcoK_{ATP}$ $mitoK_{ATP}$ and also increases the levels nicorandil Kir6.1 subunit in the $mitoK_{ATP}$ channels.

Diabetes mellitus, $sarcoK_{ATP}$, $mitoK_{ATP}$, nicorandil, fatigue, insulin.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del músculo

El músculo esquelético es el responsable de la postura y de los movimientos del esqueleto (de aquí su nombre). La actividad muscular es necesaria para muchas funciones. Los músculos consiguen realizar su función gracias a la posibilidad de transformar energía química en energía mecánica (López y Fernández, 2006).

Existen varios tipos de músculos. Basándonos en la apariencia microscópica se dividen en estriado y liso. El estriado se subdivide a su vez en esquelético y cardiaco (Figura 1) (Palacios *et al.*, 2005). Esta clasificación se basa en el grado de orden y distribución de las proteínas contráctiles actina y miosina. Sin embargo, hay diferencias en la estructura y en la fisiología de los tipos de músculo: en la naturaleza de inervación, en la forma de los potenciales de acción y en la relación entre estos y la generación de una fuerza contráctil (Palacios *et al.*, 2005).

1.1.1 Músculo liso

Obtiene su nombre del aspecto homogéneo de su citoplasma bajo el microscopio. Las fibras contráctiles no están organizadas en sarcómeros, razón por la cual el músculo liso no tiene patrones de bandas definidas como el músculo estriado. En cambio, la actina y la miosina están dispuestas en haces largos que

se extienden diagonalmente alrededor de la periferia celular formando una red o malla alrededor del núcleo central. Este tipo de músculo está bajo control involuntario (autónomo). Las fibras musculares lisas son pequeñas, fusiformes y con un único núcleo central. Las células musculares lisas están conectadas eléctricamente entre sí, de modo que un potencial de acción en una célula se propaga rápidamente a través de uniones en hendidura para permitir que se contraigan como una sola unidad. Carece de regiones receptoras especializadas como las placas terminales motoras halladas en las sinapsis del músculo esquelético, por lo tanto, en el músculo liso el neurotransmisor simplemente difunde a través de la superficie celular hasta que encuentra el receptor (Palacios *et al.*, 2005; Silverthorn, 2009).

1.1.2 Músculo estriado

Se le denomina así porque al microscopio óptico muestra un patrón de estriación transversal uniforme. Se subdivide en: Músculo esquelético y músculo cardiaco. El músculo esquelético se encuentra usualmente bajo control voluntario. Las fibras musculares son gruesas, largas, multinucleadas, agrupadas en sarcómeros. El músculo esquelético de los vertebrados se organiza generalmente en grupos llamados unidades motoras. Cada músculo en la placa neuromuscular recibe una o pocas conexiones sinápticas de una única motoneurona (con acetilcolina como neurotransmisor), cuyo soma se localiza en la médula. Un potencial de acción se propaga en la superficie de cada célula muscular en respuesta a un potencial axonal y se produce una respuesta del tipo todo o nada

(Silverthorn, 2009). El músculo cardíaco está bajo control involuntario (aunque puede existir cierto grado de control pero de manera indirecta). Las células son más pequeñas que las esqueléticas y son uni o binucleadas. Están unidas por cada extremo con otras células musculares cardíacas con discos intercalares especializados para formar una red tridimensional (conexiones). Cada célula cardíaca está conectada eléctricamente a las células adyacentes formando un sincitio eléctrico, así el músculo cardíaco entero se contrae como una unidad. El músculo cardíaco está inervado difusamente por fibras nerviosas simpáticas (excitadoras, adrenérgicas) y parasimpáticas (inhibidoras, colinérgicas) (Eckert *et al.*, 1989; Silverthorn, 2009).

1.2 Estructura del músculo esquelético

El músculo esquelético contiene numerosas miofibrillas, largas y cilíndricas. Las miofibrillas contienen bandas claras (I, isotrópicas) y bandas oscuras (A, anisotrópicas) de manera alternada (Figura 2). Una banda oscura transversal (línea Z) corta cada banda clara en dos. A la porción de las miofibrillas definida entre dos líneas Z se le llama sarcómero, el cual es la unidad estructural y funcional del músculo esquelético. Contiene una matriz de filamentos de actina y de miosina. Los filamentos gruesos de miosina están intercalados con los filamentos delgados de actina. Al área de solapamiento de actina y de miosina forman la banda A. En el centro de la banda A está la región central de la miosina, donde no hay solapamiento con la actina, es la banda H. En el centro de la banda

H esta la banda M, donde se anclan los filamentos de miosina (Silverthorn, 2009; Pancorbo, 2012).

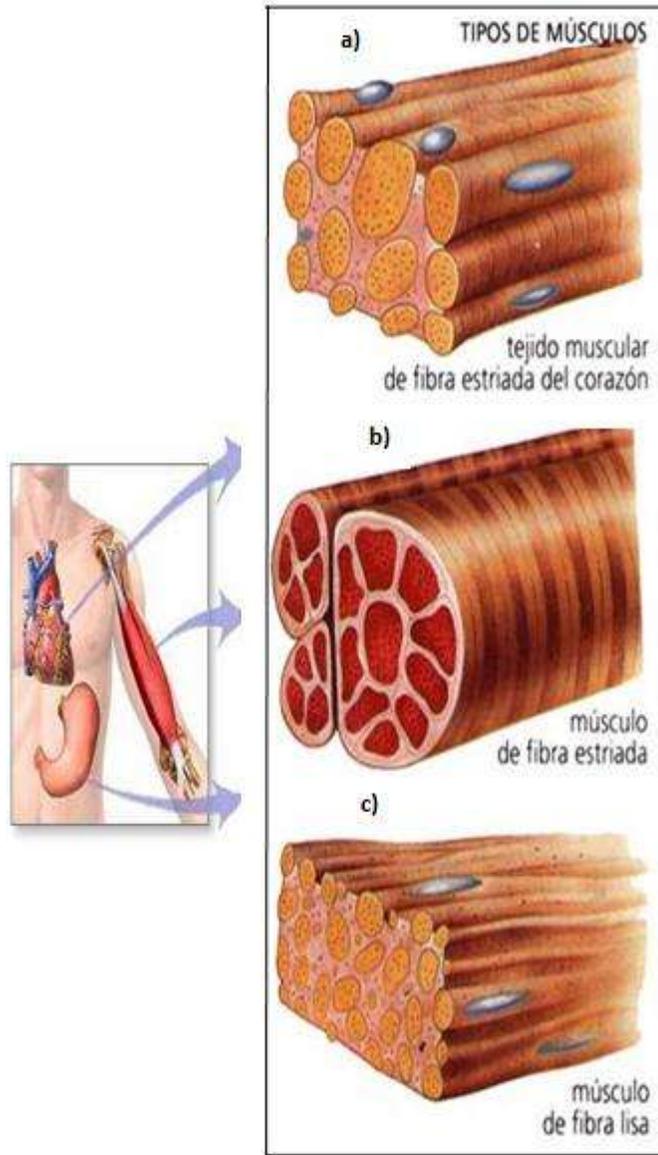


Figura 1. Los tres tipos de músculos presentes en vertebrados y su aspecto bajo el microscopio. Se aprecian las diferentes características morfológicas de los músculos. a) músculo cardiaco, b) músculo esquelético, c) músculo liso. (Silverthorn, 2009)

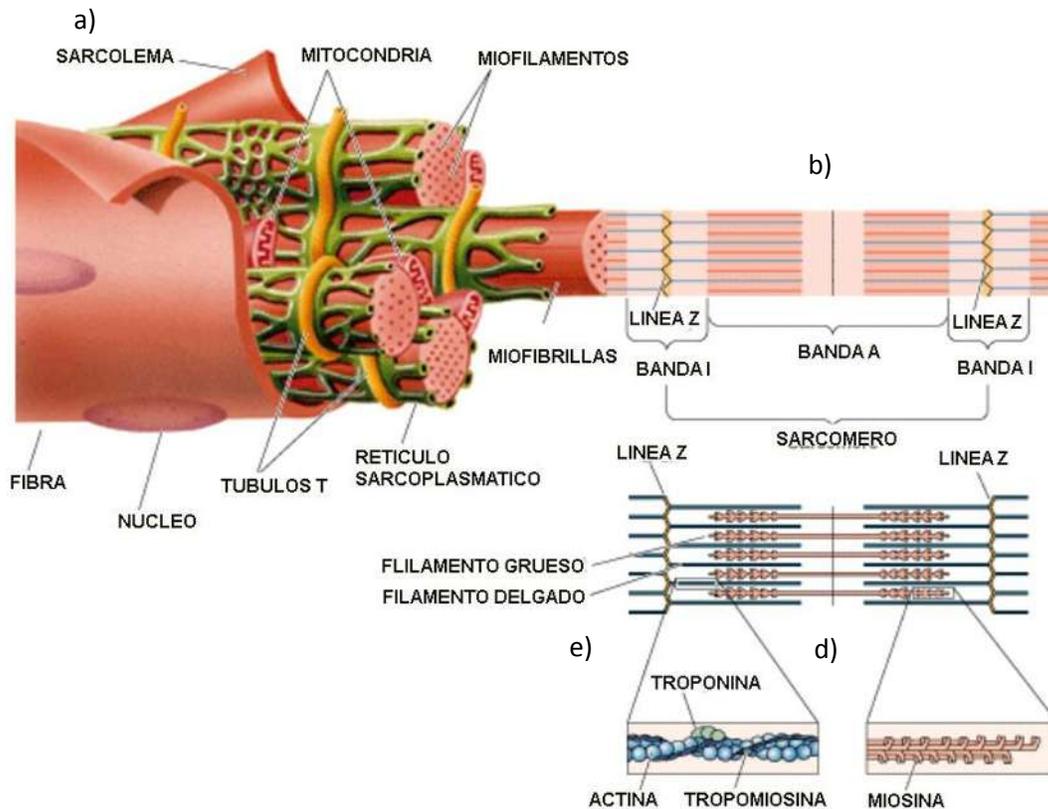


Figura 2. Estructura y niveles de organización del músculo esquelético. El sarcómero es la unidad estructural y funcional del músculo esquelético. Contiene una matriz de filamentos de actina y de miosina. Los filamentos gruesos de miosina están intercalados con los filamentos delgados de actina, que formaran los puentes cruzados para dar origen a la contracción muscular. a) fibra muscular, b) sarcómero, c) línea M, d) filamentos gruesos de miosina, e) filamentos delgados de actina (Palacios *et al.*, 2005).

Las células musculares esqueléticas tienen un sistema de membranas importante, los sarcotúbulos y el retículo sarcoplasmático (Figura 3). Los sarcotúbulos son túbulos de la membrana que se invaginan formando un anillo de túbulos estrechos por el perímetro de cada sarcómero. Estos sarcotúbulos transversos se denominan túbulos T (TT). El retículo sarcoplasmático (un tipo de retículo endoplásmico que no contiene ribosomas) es un sistema de membranas

intracelulares donde las cisternas terminales están en íntimo contacto con los TT. El retículo sarcoplasmático de un sarcómero, el TT y el retículo sarcoplasmático del sarcómero adyacente están fuertemente asociados, formando la triada. Estas estructuras son importantes en la transmisión de la despolarización eléctrica desde la superficie celular hacia el interior y en la regulación de la concentración de Ca^{2+} en el sarcoplasma (Palacios *et al.*, 2005; Silverthorn, 2009).

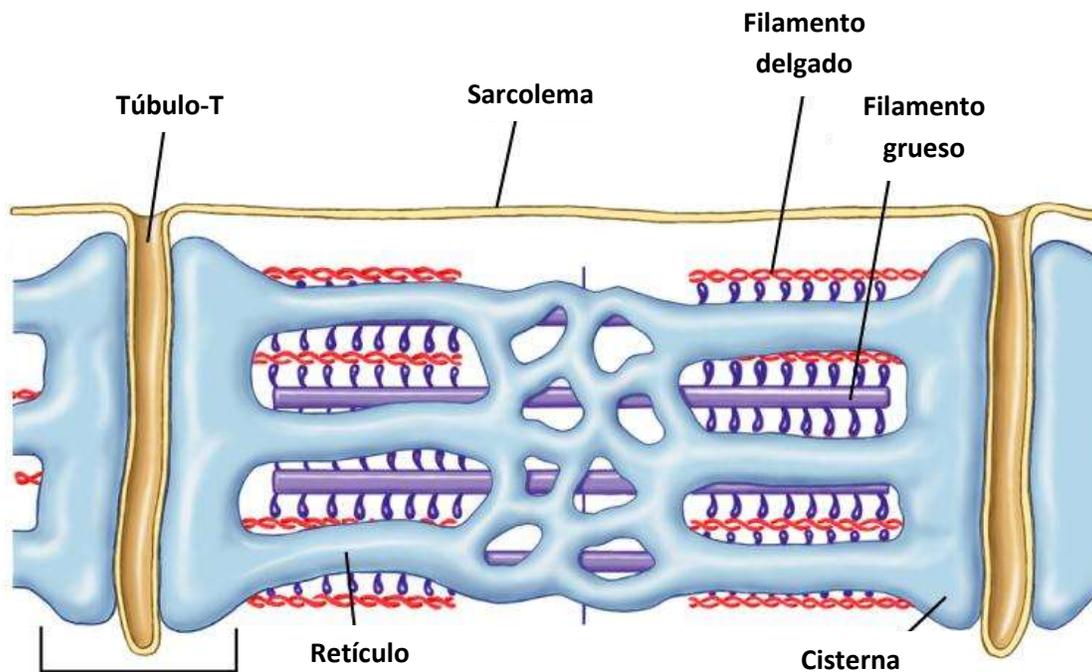


Figura 3. Estructura de las triadas formadas por los Túbulo T y el retículo sarcoplasmático. Los sarcotúbulos son evaginaciones de la membrana de cada sarcómero y se denominan túbulo T. El retículo sarcoplasmático es un sistema de membranas que funcionan como reservorios de calcio al interior de la fibra muscular y ambos conforman las triadas que son importantes para la contracción muscular (Silverthorn, 2009).

1.3 Tipos de filamentos

- Filamentos gruesos. Están compuestos principalmente por miosina. La molécula de miosina a su vez está formada por seis cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras aunque de diferente clase cada uno. Cada filamento grueso está dispuesto de modo tal que las cabezas de miosina se agrupan en los extremos y en la región central del filamento queden las colas de miosina. Las cabezas representan los puentes cruzados y las colas forman el esqueleto del filamento. Cada cabeza de miosina tiene dos sitios de unión sobre ella una para la molécula de ATP y otra para la actina (Mathews, 2002; Hill 2004; Silverthorn, 2009;).
- Filamentos delgados. Están compuestos principalmente por actina, pero también de tropomiosina y troponina. Múltiples moléculas de actina G se polimerizan para formar cadenas largas o filamentos, denominados actina F. En el músculo esquelético, dos polímeros de actina F se trenzan juntos como una doble hélice, lo que crea los filamentos delgados de la miofibrilla. Como consecuencia de la asimetría de las subunidades, el filamento de actina F tiene una direccionalidad definida, y a sus dos extremos se les denomina extremo más y extremo menos. El extremo más es el que crece con mucha mayor rapidez debido a que la dirección de polimerización presenta una dirección de preferencia. Las moléculas de actina G en los filamentos delgados están dispuestas de manera tal que las situadas a un lado del disco Z poseen orientación contraria (Mathews, 2002; Silverthorn, 2009).

Un filamento delgado es más que un simple polímero de actina F. Existen otras cuatro proteínas que son esenciales para la función contráctil. Una de esas proteínas es la tropomiosina, una proteína fibrosa, que se encuentra en forma de dímeros alargados situados a lo largo del surco de la hélice de actina F o cerca del mismo. Unidas a cada molécula de tropomiosina hay tres proteínas pequeñas denominadas troponinas I, C, y T. La presencia de estas proteínas inhibe la unión de las cabezas de miosina a la actina, a menos que haya calcio en una concentración adecuada para que permitir la unión de las cabezas (Mathews, 2002).

1.4 Clasificación de las fibras esqueléticas.

Las fibras del músculo esquelético pueden clasificarse basándose en su velocidad de contracción y su resistencia a la fatiga con la estimulación repetida: fibras de contracción lenta (tipo I, oxidativas) y fibras de contracción rápida (tipo IIA, oxidativas-glucolíticas y tipo IIB/IIX glucolíticas) (Page, 1969; Bottinelli, 2001; Spurway y Wackerhage, 2006; Silverthorn, 2009.).

Las fibras musculares de contracción rápida desarrollan tensión dos a tres veces mayor que las fibras de contracción lenta, debido que dividen el ATP más rápidamente y eso les permite completar más rápidamente múltiples ciclos contráctiles. Aunado a ello, las fibras de contracción rápida bombean Ca^{2+} hacia su retículo sarcoplásmico más rápidamente por lo cual bombean una mayor

cantidad de Ca^{2+} que las fibras de contracción lenta en un mismo periodo de tiempo (Eckert *et al.*, 1989; Bottinelli, 2001; Silverthorn, 2009).

Las fibras de contracción rápida se utilizan ocasionalmente, mientras que las fibras de contracción lenta se emplean de manera más constante, por ejemplo para mantener la postura, ponerse de pie o caminar (Silverthorn, 2009).

Otra diferencia es la capacidad de las fibras a resistir la fatiga. Las fibras glucolíticas (tipo IIB/IIX) dependen fundamentalmente de la glucólisis anaerobia para producir ATP. Sin embargo, la acumulación de H^+ a partir de la hidrólisis de ATP contribuye a la acidosis, un trastorno involucrado en la aparición de la fatiga como se verá más adelante. En consecuencia, este tipo de fibras se fatigan más rápidamente que las fibras oxidativas, las cuales no dependen del metabolismo anaerobio, sino más bien, dependen fundamentalmente de la fosforilación oxidativa para la producción de ATP. Este tipo de fibras, que incluyen las fibras de contracción lenta y las fibras glucolítico-oxidativas de contracción rápida, tienen un mayor número de mitocondrias que las fibras glucolíticas (Eckert *et al.*, 1989; Bottinelli, 2001; Hill, 2004; Silverthorn, 2009).

Las fibras tipo I, es decir, las oxidativas, contienen además de la hemoglobina, grandes cantidades de mioglobina, un pigmento rojo fijador de oxígeno con alta afinidad por el mismo, por lo tanto la difusión de oxígeno es más rápida que en las fibras glucolíticas, lo que se traduce en una mayor capacidad oxidativa para la producción de ATP. Además de la mioglobina, las fibras

oxidativas tienen diámetros pequeños, de modo que la distancia a través de la cual debe difundir el oxígeno antes de alcanzar las mitocondrias es más corta. Otra característica es que también tiene más vasos sanguíneos en su tejido conectivo para llevar oxígeno a las células (Page, 1969; Huerta y Stefani, 1981; Bottinelli, 2001; Silverthorn, 2009).

Por el contrario, las fibras glucolíticas (tipo IIB) al tener una menor cantidad de mioglobina (por lo cual se denomina músculo blanco), al ser de mayor diámetro y menos vasos sanguíneos, hace que sea más probable que se queden sin oxígeno después de las contracciones repetidas. Por lo tanto, este tipo de fibras se basan principalmente en la glucólisis anaerobia para la síntesis de ATP y se cansan más rápidamente (Eckert *et al.*, 1989; Bottinelli, 2001; Silverthorn, 2009).

Finalmente, las fibras glucolítico-oxidativas (tipo IIA) muestran tanto propiedades de las fibras oxidativas como de las fibras glucolíticas. Son más pequeñas que las fibras glucolíticas, pero lo más sobresaliente es que utilizan una combinación de metabolismo oxidativo y glucolítico para la producción de ATP. Las fibras glucolítico-oxidativas son más resistentes a la fatiga que las glucolíticas tipo IIB, debido a su tamaño intermedio y el uso de la fosforilación oxidativa para la síntesis del ATP, adicionalmente, el alto contenido de mioglobina que les da una coloración rojiza también se denomina junto con las fibras oxidativas tipo I como músculo rojo (Eckert *et al.*, 1989; Palacios *et al.*, 2005; Botinelli, 2001; Silverthorn, 2009).

1.5 Teoría del deslizamiento de los filamentos.

La teoría del deslizamiento de los filamentos fue propuesta en 1954 por Huxley y Neideigerke y de manera general establece que los filamentos de actina y miosina de un sarcómero están dispuestos de tal manera que pueden deslizarse unos sobre otros, quedando solapados aproximando entre si los discos Z y dando lugar a un acortamiento del músculo en un proceso que requiere energía (Figura 5) (Palacios *et al.*, 2005; Silverthorn, 2009).

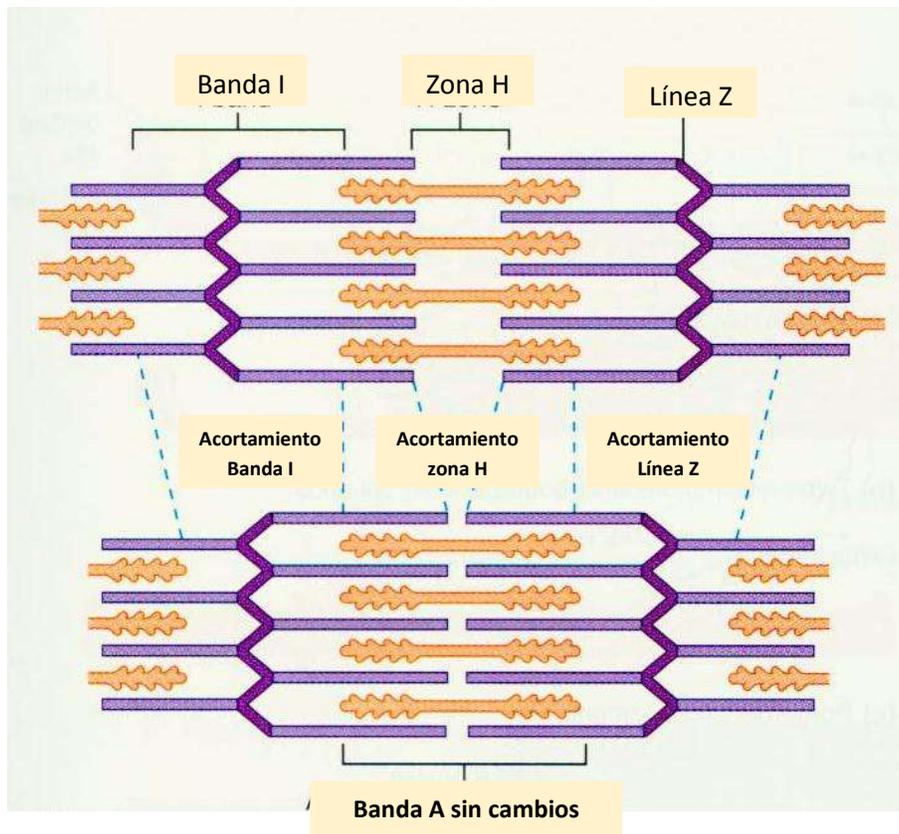


Figura 4. El Sarcómero en estado de relajación y el sarcómero acortado por contracción muscular. Las miofibrillas contienen bandas I (isotrópicas) y bandas A (anisotrópicas) de manera alternada. Una banda A transversal (línea Z) corta cada banda I en dos, la porción de las miofibrillas definida entre dos líneas Z se le llama sarcómero. En el centro de la banda A está la región central de la miosina, donde no hay solapamiento con la actina, es la banda H. Durante el golpe de fuerza o tirón, base de la contracción muscular, el movimiento de los puentes cruzados de miosina flexibles empuja los filamentos de actina hacia el centro del sarcómero, lo que provoca los cambios en el tamaño de los sarcómeros (Silverthorn, 2009).

La fuerza que empuja el filamento de actina es el movimiento de los puentes cruzados de miosina que unen la actina y la miosina. Durante el golpe de fuerza o tirón, base de la contracción muscular, el movimiento de los puentes cruzados de miosina flexibles empuja los filamentos de actina hacia el centro del sarcómero. Al final de un golpe de fuerza, cada cabeza de miosina libera la actina que está unida a ella, luego oscila hacia atrás y se une a una nueva molécula de actina lista para iniciar otro ciclo a medida que se acorte la fibra muscular (López y Fernández, 2006; Silverthorn, 2009). Cada puente cruzado de la miosina que interacciona con el filamento de actina proporciona el desarrollo de tensión o fuerza y la tensión total producida por el sarcómero deberá ser proporcional al número de puentes cruzados establecidos con los filamentos de actina. La unión permanente de la miosina con la actina tiene lugar en ausencia de ATP o cuando se bloquea el lugar del ATP, localizado en el filamento de miosina (Eckert *et al.*, 1989; Silverthorn, 2009). La porción de la cabeza de los filamentos de miosina es la única de toda molécula que presenta actividad de ATPasa y es la que se une con la actina y es precisamente por esto que el ATP desempeña una participación muy importante durante los puentes cruzados, debido a que la miosina es una proteína motora que tiene la capacidad de crear movimiento. La miosina logra esta tarea convirtiendo la energía química del enlace del ATP en energía mecánica del movimiento. Cada molécula de miosina es una ATPasa a la que se le une el ATP y lo hidroliza en ADP y fosfato inorgánico (Pi), y con ello la liberación de energía (Silverthorn, 2009; Pancorbo, 2012).

II. ANTECEDENTES

2.1 La Diabetes Mellitus

En la actualidad, el número de personas con enfermedades crónicas degenerativas va en aumento, debido al tipo de vida sedentario que poseemos, la mala alimentación y la predisposición genética. Entre ese tipo de enfermedades destaca la Diabetes Mellitus (DM). Los cálculos más recientes de la Federación Internacional de Diabetes (FID) indican que el 8,3 % de los adultos –382 millones de personas– tienen diabetes, y el número de personas con esta enfermedad se incrementará en más de 592 millones en menos de 25 años (Figura 6). Sin embargo, con 175 millones de casos no diagnosticados actualmente, una gran cantidad de personas con diabetes van a desarrollar progresivamente complicaciones de las que no son conscientes (FID, 2013).

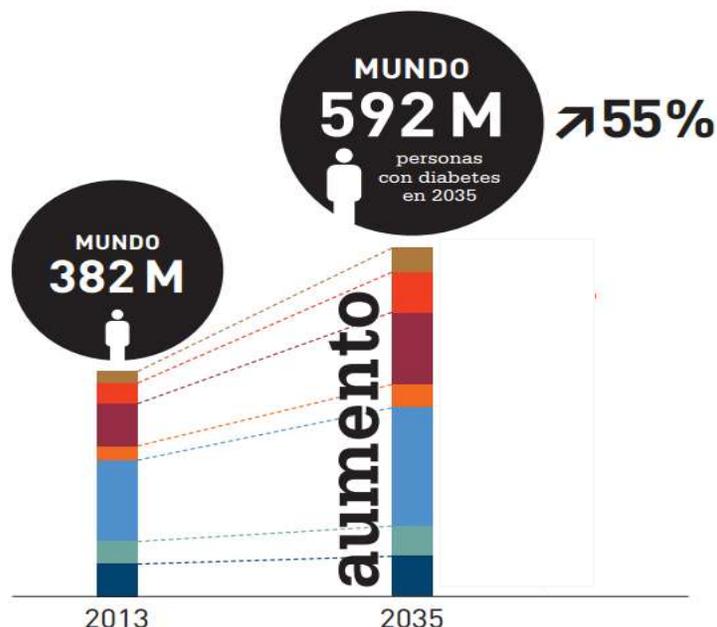


Figura 5. Estimación del incremento en la incidencia de DM en la población mundial. Debido a la alta tasa de incidencia de esta enfermedad, actualmente representa un grave problema de salud pública con alcance a nivel global (Modificado de Atlas de la diabetes FID 2013).

Tanto en términos epidemiológicos como financieros, la carga de la diabetes es enorme, provocó 5,1 millones de muertes y representa unos 548.000 millones de dólares en gastos de salud (11 % del gasto total en todo el mundo) en 2013. En lo que respecta a México, nuestro país ocupa el sexto lugar a nivel global en cuanto al número de personas que padecen dicha enfermedad (Figura 7), por lo cual es importante el estudio de dicha enfermedad, así como de las complicaciones que se derivan del padecimiento de la misma.

Los 10 principales países/territorios por número de personas con diabetes (20-79 años), 2013

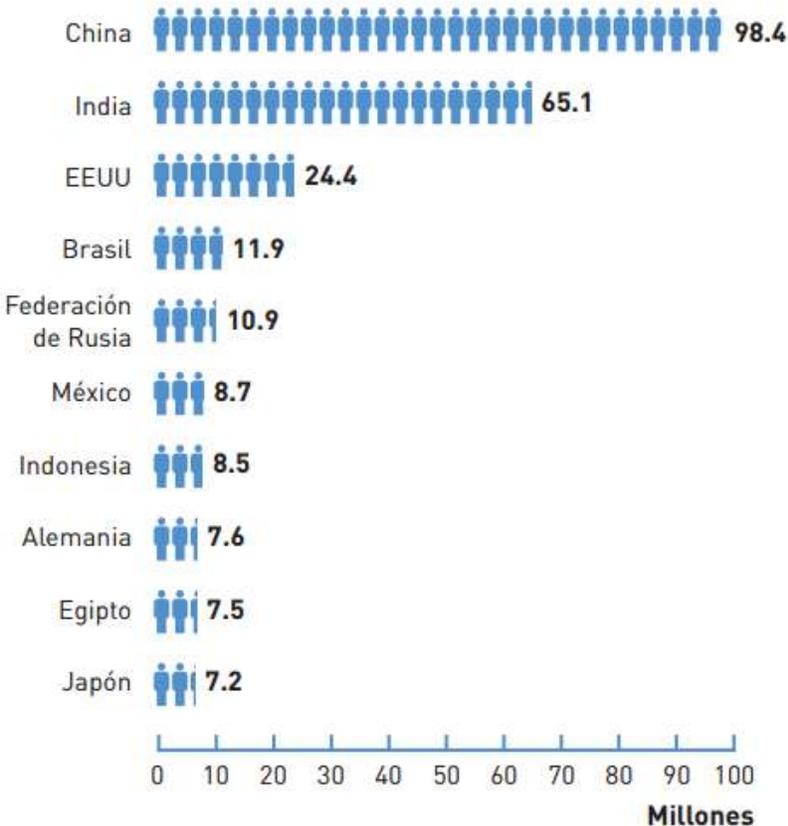


Figura 6. Principales países con el mayor número de individuos con DM. México es uno de los países a nivel global que presenta una mayor incidencia de esta enfermedad en su población (Modificado del Atlas de la diabetes de la FID 2013).

2.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus

La DM se caracteriza por el desarrollo de hiperglucemia crónica, provocada por una deficiencia en la producción de insulina, la acción de la insulina o la combinación de ambos factores, lo cual afecta principalmente el metabolismo de los carbohidratos, pero también de proteínas y grasas. Otros de sus síntomas son la aparición de poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida extrema de peso (López, 2009).

De acuerdo a su etiología la DM se clasifica principalmente en cuatro grupos: diabetes tipo 1 (DM1), diabetes tipo 2 (DM2), diabetes gestacional (DG) y otros tipos de diabetes (OD) (FID 2013).

2.2.1 Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 es causada por una reacción autoinmune, durante la cual el sistema inmunológico destruye las células β del páncreas, las cuales son responsables de la producción y secreción de la insulina. Como resultado de lo anterior, ya no existe producción de insulina para el metabolismo de la glucosa. Si bien, es cierto que esta enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, se presenta principalmente en jóvenes y niños, tanto así que constituye uno de los principales problemas de salud en la población pediátrica mundial, siendo la enfermedad endocrinológica más frecuente de la infancia (Martínez *et al.*, 2002).

Existen una amplia variedad de factores involucrados en el origen de la enfermedad, uno de ellos está regido por los factores genéticos. Entre los factores genéticos detonantes se ha mencionado a los antígenos de histocompatibilidad HLA, DR3, DR4, DQ α y DQ β , involucrados en el proceso de discriminación entre lo propio y lo extraño, ya que se ha observado que cuando ocurren los procesos de autoinmunidad que derivan en la destrucción de las células β del páncreas previamente han ocurrido alteraciones en dichos genes, así como en la inducción y regulación de las respuestas celulares y humorales (Wintrob *et al.*, 2001).

Las complicaciones metabólicas derivadas del padecimiento de este tipo de diabetes consisten inicialmente en una disminución gradual hasta la ausencia completa en la producción de insulina y en consecuencia su transporte al interior del músculo y el tejido adiposo también disminuye, por lo cual aumenta la concentración de glucosa en sangre. De igual modo, otro de los factores que contribuyen al aumento de glucosa en sangre es que al existir una disminución de esta hormona en el hígado, favorecen la degradación del glucógeno almacenado en los músculos y en consecuencia un aumento en la glucogénesis (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003).

La incapacidad de utilizar la glucosa como fuente de energía, da como resultado la necesidad de utilizar como fuentes alternas las grasas y proteínas (sobre todo las musculares para la obtención de aminoácidos). Al incrementar la degradación de proteínas en consecuencia incrementan los niveles de urea provocando un balance negativo de nitrógeno. La lipólisis también se favorece por la falta de glucosa en el adipocito, además, el aumento relativo de glucagón

produce la salida de ácidos grasos, parte de los cuales se utilizan como combustible y/o se transforman a cuerpos cetónicos en el hígado (Fernández, 1996).

En la forma más avanzada de la DM1, el catabolismo del glucógeno, proteínas y en especial de lípidos, sobrepasa las necesidades nutricionales del paciente y ocasiona un exceso de cuerpos cetónicos, provocando cetoacidosis y coma diabético. Incluso la cetoacidosis es una característica clínica diferencial entre la DM1 y DM2; aparentemente la diferencia radica en la cantidad de insulina producida entre los dos tipos del padecimiento, ya que la pequeña cantidad de insulina producida en la DM2 es capaz de bloquear la producción de ácidos grasos a partir de la lipólisis, lo que evita la sobreproducción de cuerpos cetónicos. En general, los desarreglos metabólicos en la DM1 se explican por la falta de insulina, sin embargo, las bases metabólicas de la DM2 no son tan evidentes (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003).

Actualmente, no se sabe a ciencia cierta cómo es que se produce el proceso de autodestrucción de las células β del páncreas ni qué lo origina, ni porqué una vez que inicia no puede detenerse y porqué las células β del páncreas dañadas no se regeneran. Aunque al respecto de esto último, se sabe que las personas que no padecen DM poseen un mecanismo de anti-apoptosis y aparentemente este mecanismo se ha perdido en las personas con DM (López, 2009).

2.2.2 Diabetes tipo 2

La diabetes tipo II es la más frecuente, y en ella predomina la incapacidad de incorporar glucosa a las células musculares y al tejido adiposo (resistencia a la insulina) aunado a una relativa deficiencia en la secreción o acción de la insulina. Se ha postulado que existe un componente genético muy importante que alteraría la secreción de la insulina a través de la regeneración de las células beta, resistencia a la insulina o ambas. A este componente genético se suman otros factores ambientales como la obesidad, el sedentarismo, tabaquismo, estrés, entre otros, que propician el desarrollo de este tipo de diabetes (Wagman, 2001).

Se ha sugerido que en la aparición de la DM2, está relacionada con alteraciones en genes de susceptibilidad, tal como lo demuestran estudios de diversas regiones cromosómicas, donde se han observado cambios en las secuencias nucleotídicas de genes que codifican proteínas involucradas en la incorporación y el metabolismo de la glucosa, así como en la señalización y secreción de la insulina, tal como revisaremos a continuación (Friedman, 1999).

El gen de la insulina fue uno de los primeros en estudiarse con fin de poder explicar el origen de la DM2. Se han descrito dos mutaciones en dicho gen, la primera de ellas produce una alteración en las cadenas α y β , afectando así, el acoplamiento de la insulina con su receptor, y en consecuencia, activar la vía de señalización respectiva. Mientras que la segunda mutación resulta de un error en el procesamiento de la proinsulina. Ambas mutaciones tienen como resultado alteraciones en la homeostasis de la glucosa.

Otro de los genes estudiados es el que codifica para el receptor de insulina (IR). Este receptor está ubicado en las membranas celulares y es el responsable de iniciar la señalización para la introducción de la glucosa a la célula. En uno de los trabajos clásicos respecto al estudio de la diabetes desarrollado por Taylor y colaboradores (1991) derivó en que las mutaciones de este gen se clasificaron en 5 clases de acuerdo a su acción: 1) disminución de la biosíntesis del receptor, 2) reducción del transporte del receptor a la superficie celular, 3) disminución en la afinidad de la unión con la insulina, 4) disminución en la actividad de tirosina-cinasa y 5) degradación acelerada del receptor.

El sustrato receptor de insulina (IRS) es otro de los componentes clave en la vía de señalización del metabolismo de la glucosa, por lo tanto también ha sido blanco de múltiples estudios para encontrar mutaciones que pudieran estar afectando dicha vía de señalización. A la fecha, se han identificado cuatro isoformas del IRS, entre los que el IRS-1 y el IRS-2 son los más involucrados en esta vía de señalización. Se ha observado que la alteración del IRS-1, en ratones, origina retardo en el crecimiento y resistencia a la insulina asociada a hipertensión, hipertrigliceridemia, y un marcado defecto en la secreción de insulina. Por otro lado, el polimorfismo en el gen IRS-2 está ligado a la etiología de la diabetes, además la alteración de este gen causa anormalidades en la homeostasis de la glucosa, debido a la resistencia de la insulina hepática y una falla compensatoria en su secreción de las células β -pancreáticas; por lo anterior, estos dos genes son candidatos para explicar el origen de la DM2 (Whitehead *et al.*, 2000).

Finalmente, el transporte de glucosa en la célula se realiza por proteínas específicas (GLUT), por lo que un defecto en estos transportadores tiene un importante papel en la patogénesis de la resistencia periférica a la insulina. El GLUT-4 es una isoforma de este grupo cuya expresión está limitada a tejidos con respuesta a la insulina, como el músculo esquelético, cardíaco y el tejido adiposo. En estos sitios, GLUT-4 regula el aumento de glucosa de acuerdo a tres pasos: 1) segregación de GLUT-4 dentro de vesículas especializadas, 2) transporte de estas vesículas a la membrana plasmática y 3) exposición de la proteína a la superficie celular. Por lo tanto, una alteración en la secuencia nucleotídica puede derivar en alteraciones en el transporte de la glucosa y ocasionar hiperglucemia (Wagman, 2001).

2.3 Complicaciones clínicas de la Diabetes Mellitus

Las personas con diabetes corren el riesgo de desarrollar una serie de problemas de salud que pueden provocar discapacidad o incluso la muerte. Los constantemente niveles de glucosa en sangre altos pueden conducir a enfermedades graves que afectan al corazón, los vasos sanguíneos, los ojos, los riñones y los nervios. Las personas con diabetes también tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones.

La fatiga se presenta como una “queja” o síntoma común entre los pacientes con DM, aproximadamente en un 60 % de los pacientes la refiere. La fatiga es un síntoma asociado a la calidad de vida del paciente, además se le ha asociado con el riesgo de tener complicaciones (Fritschi y Quinn, 2010). Así,

Lasselin y colaboradores (2012), reportaron que esta fatiga está más asociada a aspectos físicos que mentales. Es claro que al no contar con la energía suficiente el sistema músculo-esquelético se verá disminuido en sus posibilidades de movimiento.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la DM2 en concreto, se caracteriza por una disminución en la secreción de insulina y un incremento en la resistencia a la insulina, resultado en alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Esto en consecuencia se manifiesta como una elevación de la glucosa con altos rangos de variabilidad, a lo que se le ha atribuido como la causa de fatiga durante esta patología (Bonora *et al.*, 2001).

Además, existen varios reportes sobre los efectos que tiene la diabetes sobre la fisiología del músculo, reflejándose como atrofia, debilidad y una incrementada susceptibilidad a la fatiga (Andersen, 2012). Los cambios en la función muscular se deben a una combinación de factores: alteraciones en las α -motoneuronas, en las placas neuromusculares y en las mismas fibras musculares (Ramji *et al.*, 2007). La pérdida de la fuerza se ha ligado a una excesiva infiltración de grasa lo que ocasiona disturbios en la organización fascicular (Hilton *et al.*, 2008) y la pérdida de las fibras tipo II y su denervación selectiva (Gutiérrez *et al.*, 2001).

Se ha asociado el incremento de la grasa en el músculo, con la resistencia a la insulina (Toledo, 2014). Existen reportes de que las mitocondrias del músculo esquelético diabético muestran una reducción en su capacidad de oxidación

(Kelley *et al.*, 2002), sin embargo, también se le atribuido a este proceso el sedentarismo que es característico de las personas con diabetes y/o obesidad (Toledo *et al.*, 2008).

Por su parte, los aspectos biomecánicos como los tendones tienden a mostrar una sintomatología similar a la del envejecimiento (sarcopenia), lo que se caracteriza por cambios en la forma de las fibras de colágeno, un incrementado empaquetamiento y endurecimiento de las mismas (Grant *et al.*, 1997).

Por todo lo anterior, a continuación, se describen los principales aspectos relacionados con la fatiga muscular.

2.4 La fatiga muscular

Asmussen (1979) la definió como la disminución transitoria de la capacidad de trabajo del músculo esquelético durante la actividad física. Por otro lado, Edwards (1981) la consideró como la incapacidad de mantener la potencia desarrollada, es decir, la intensidad del esfuerzo durante un determinado tipo de ejercicio. Existen muchas definiciones, sin embargo, todas ellas reconocen en mayor o menor medida, ciertas características fundamentales de la fatiga como la disminución de la capacidad de esfuerzo o rendimiento y la disminución de la capacidad para generar fuerza muscular máxima (López y Fernández, 2006; Allen *et al.*, 2008).

Debemos tomar en cuenta que la fatiga va apareciendo de forma progresiva desde el inicio del esfuerzo. Por esta razón, la mayoría de los fisiólogos prefieren

definir la fatiga como la disminución de la capacidad para generar fuerza máxima o potencia máxima (López y Fernández, 2006).

Los autores sostienen que tanto la disminución de la energía suministrada como la acumulación de metabolitos, pueden provocar un descenso de la fuerza muscular y por lo tanto, la aparición de fatiga (Allen *et al.*, 2008). Los sustratos metabólicos mayormente responsables del suministro de energía durante la contracción muscular dependen de cuatro factores específicos: la intensidad del esfuerzo, la duración del esfuerzo, la disponibilidad de sustratos energéticos así como las modificaciones del entorno hormonal desencadenadas por el esfuerzo (López y Fernández, 2006).

La fatiga se ha clasificado en fatiga de origen central y fatiga de origen periférico. Cuando está alterado alguno o varios de los procesos que intervienen desde que se elabora la orden motora a nivel cortical, hasta que el estímulo llega al sarcolema, se habla de fatiga central. En cambio, si la alteración se produce en el funcionamiento del sarcolema o de cualquiera de los procesos que acontecen en el interior de las fibras musculares, entonces se habla de fatiga periférica. Es importante señalar que en determinadas condiciones, operan simultáneamente mecanismos centrales y periféricos (López y Fernández, 2006; Allen *et al.*, 2008).

2.5 Los canales de K⁺ sensibles a ATP

Los canales de K⁺ sensibles a ATP fueron descritos por vez primera en 1987 por Noma en parches aislados de membrana plasmática de cardiomiocitos ventriculares (Noma, 1987). Posteriormente fueron encontrados en diversos tipos

de tejidos, tales como cerebro (Ashford *et al.*, 1988), páncreas (en el cual se les ha relacionado con la secreción de insulina) (Cook y Hales, 1984), el músculo liso (Standen *et al.*, 1989) y por su puesto el músculo esquelético (Spruce *et al.*, 1987; Tricarico *et al.*, 2010). Los canales de K⁺ sensibles a ATP mitocondriales (mitoK_{ATP}), se descubrieron en 1991 por Inoue y colaboradores en mitoplastos gigantes preparados a partir de mitocondrias de hígado de rata.

Los canales K_{ATP} acoplan el estado metabólico de la célula a su actividad eléctrica y juegan un papel importante en varias funciones celulares, tales como sensores de ATP y ADP intracelular (Inagaki *et al.*, 1988). Estos canales en su composición molecular tienen receptores de sulfonilureas (subunidades SUR) acopladas a un canal de potasio tipo rectificador de entrada (K_{ir}6.x) y en conjunto forman un octámero con una estequiometría 4:4 para completar la forma del canal (Barret-Jolley *et al.*, 1998). La subunidad SUR actúa como reguladora y le confiere la sensibilidad al ADP y las características farmacológicas distintivas de los canales K_{ATP}. La subunidad K_{ir} forma el poro del canal, el cual media la inhibición dependiente de ATP de estos canales (Andrade, 2011).

La función de los canales K_{ATP} del sarcolema (sarcoK_{ATP}) depende de la concentración de ATP. Este tipo de canales tiene baja probabilidad de apertura en condiciones de reposo, pero incrementan su apertura cuando bajan las concentraciones de ATP, promoviendo la entrada de potasio, con lo cual aleja a las células del umbral de excitación. Así, la actividad electrofisiológica de los canales K_{ATP} acopla el estado metabólico de la célula (Inagaki *et al.*, 1998) y su

función ha recibido importancia en enfermedades tales como la diabetes, la isquemia cardíaca o neuronal y en la fatiga muscular.

Los canales K_{ATP} juegan roles importantes en diversas funciones celulares de diferentes órganos, tal es el caso de las células β del páncreas donde los canales K_{ATP} permiten regular la secreción de insulina y por lo tanto modular el volumen de glucosa en la sangre (Ashcroft *et al.*, 1989 a, b). Inclusive los canales K_{ATP} se expresan en otras células endocrinas, como las células α -secretoras de glucagón y las células δ -secretoras de somatostatina (inhibe la secreción de insulina y glucagón en el caso del páncreas) (Gopel *et al.*, 2000 a, b). Trastornos ocurridos en los canales K_{ATP} de las células β del páncreas derivan en diversas consecuencias como la alteración de la homeostasis de la glucosa sanguínea. Otros estudios descubrieron al trabajar con ratones que carecían de una subunidad $K_{ir}6.1$ o SUR1 tendían a desarrollar hipoglucemia neonatal transitoria (Miki *et al.*, 1998; Seghers *et al.*, 2000). En el caso de humanos se ha detectado una serie de polimorfismos en las subunidades $K_{ir}6.1$ y SUR1 y que al parecer derivan en hipoglucemia y la diabetes.

En el cerebro, se ha descrito la presencia en el hipotálamo de neuronas “glucosensitivas” (Ashford *et al.*, 1990; Routh, 2002), las cuales llevan a cabo la detección de los niveles de glucosa, lo que permite orquestar ciclos como el de sueño-vigilia, el gasto energético y la necesidad de alimentación. Son precisamente algunas de estas neuronas “glucosensitivas” las que expresan los canales K_{ATP} y se cree que desarrollan una estrategia similar a la mostrada en las

células β -pancreáticas (Hibino *et al.*, 2010). Otra función importante de los canales K_{ATP} es que pueden desempeñar un papel protector en las neuronas en condiciones patológicas (Ballanyi, 2004; Yamada, 2005). Durante los periodos de hipoxia e isquemia, se sabe que la mayoría de las neuronas de mamíferos se despolarizan y posteriormente mueren, debido a que no existe un aporte suficiente de nutrientes y oxígeno. En el caso de la sustancia negra *pars reticulata* (SNr), los canales K_{ATP} suprimen la actividad neuronal durante la hipoxia mediante la apertura de los canales de K_{ATP} post-sinápticos (Murphy y Greenfield, 1991; Jiang *et al.*, 1994). Contrario a lo que se observó en ratones *knockout-Kir6.2* en los cuales sus neuronas no presentan esa condición de protección (Yamada *et al.*, 2001).

En lo que respecta a el músculo esquelético, la presencia del canal fue descrito por primera vez en 1985 por Spruce y colaboradores y a partir de entonces las propiedades farmacológicas y fisiológicas se han estudiado en diversos vertebrados. Una característica importante del metabolismo del músculo esquelético, es que su tasa metabólica cambia drásticamente durante la contracción muscular. Ese cambio deriva en un aumento de los requerimientos de ATP y por lo tanto también se produce una alteración en la actividad del canal $sarcoK_{ATP}$ de los músculos esqueléticos. Los canales $sarcoK_{ATP}$ permanecen inactivos durante el reposo y en cambio son activados durante la fatiga (Light *et al.*, 1994). Su apertura aumenta la corriente de salida de K^+ , lo que permite acortar la duración del potencial de acción (Gramolini y Renaud, 1997). Incluso se sugiere que la activación del canal $sarcoK_{ATP}$ contribuye a la disminución de la fuerza

tetánica (Duty y Allen, 1995). En otros trabajos se ha examinado la actividad del canal $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ durante la fatiga, esto al comparar ratones sanos versus ratones *knockout-K_{ir}6.2*, y se observó que no existía ninguna diferencia durante la fatiga en la disminución de la fuerza tetánica en el músculo sóleo y en el músculo *extensor digitorum longus* (EDL) entre ambas condiciones. Sin embargo, los ratones *knockout-K_{ir}6.2* mostraron un aumento significativo en la tensión de reposo. También se observó que la recuperación de la fuerza tetánica después de la fatiga fue significativamente menor en los ratones *knockout-K_{ir}6.2* que los ratones sanos, lo que sugiere que la función principal del canal $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ durante la fatiga, es reducir el desarrollo de la tensión de reposo y que por lo tanto el canal $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ juega un papel importante en la protección muscular (Gong *et al.*, 2000). Kane y colaboradores (2004) así como y Thebet y colaboradores (2005) refuerzan esta teoría ya que también le atribuyen un papel protector al canal $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ para evitar el daño de las fibras musculares durante el ejercicio y la fatiga. Un mecanismo propuesto para dicha protección establece que se reduce la actividad de las bombas $\text{Ca}^{+}\text{-ATPasa}$ y la miosina ATPasa para preservar el ATP (Matar *et al.*, 2000).

Estudios de Matar *et al.* (2000), sugieren que una vez activados los canales $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ tienen dos efectos: 1) reducen la tensión generada por el aparato contráctil durante la contracción y, 2) previenen un gran incremento en la tensión de reposo. La composición molecular, las propiedades biofísicas y la respuesta farmacológica de los canales K_{ATP} en el músculo esquelético son fenotipo-

dependientes y específicas del tipo muscular (Tricarico *et al.*, 2006; Tricarico *et al.*, 2010).

De acuerdo a Pulido y colaboradores (1996) y Miki y colaboradores (2002), además de su función en la actividad contráctil del músculo esquelético, los canales $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ parecen estar también implicados en la absorción de glucosa por parte del músculo esquelético, sin embargo, el mecanismo de cómo se lleva a cabo dicha participación aún no es completamente conocido.

2.6 Estructura de los canales de K^+ sensibles a ATP

La estructura molecular de los canales K_{ATP} se ha ido identificado a través de trabajos de clonación de los miembros de las subfamilias de los canales rectificadores de entrada $\text{Kir}6.x$ ($\text{Kir}6.1$ y $\text{Kir}6.2$) (Sakura, 1995) y de los receptores de sulfonilureas (SUR1, SUR2A y SUR2B) (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Inagaki *et al.*, 1996; Tricarico *et al.*, 2010) que forman los sitios de unión del ATP y que son miembros de la superfamilia de proteínas (ABC) ha permitido el entendimiento de la estructura de los canales K_{ATP} (Seino *et al.*, 1999).

Estudios de reconstitución han demostrado que las diferentes combinaciones de las subunidades de la familia $\text{Kir}6.x$ y SUR, constituyen los canales de K_{ATP} con diferentes grados de sensibilidad a los nucleótidos, así como diferencias en su farmacología (Hibino *et al.*, 2010).

Es por ello, que debido a trabajos como los anteriormente mencionados, se ha propuesto que el canal de K_{ATP} es un complejo hetero-octámero que comprende dos tipos de subunidades: un poro formado por subunidades $K_{ir6.x}$ ($K_{ir6.1}$ o $K_{ir6.2}$) y subunidades reguladoras SUR (SUR1, SUR2A O SUR2B) (Figura 8), la cual funciona como un receptor de las sulfonilureas y por lo que es ampliamente utilizado en el tratamiento de la DM2 (Moreau *et al.*, 2005).

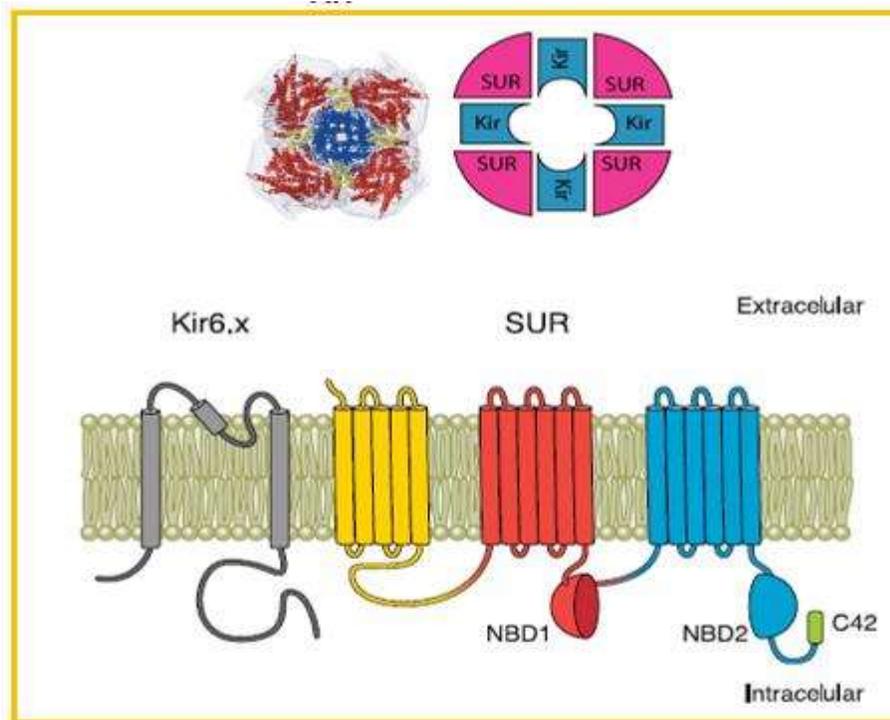


Figura 7. Estructura del canal K_{ATP} y las subunidades que lo conforman. El canal de K_{ATP} es un complejo hetero-octámero que comprende dos tipos de subunidades: un poro formado por subunidades $K_{ir6.x}$ ($K_{ir6.1}$ o $K_{ir6.2}$) y subunidades reguladoras SUR (SUR1, SUR2A O SUR2B) Modificado de Hibino *et al.*, (2010).

2.6.1 Subunidades $K_{ir6.x}$

La actividad y las funciones fisiológicas de los canales K_{ir} dependen de la regulación de la apertura del poro, el flujo de iones y la localización de los canales

en la célula. Los principales factores que regulan la apertura de los poros y el flujo de iones a través del canal incluyen iones, poliaminas, nucleótidos, lípidos y una variedad de proteínas intracelulares (Hibino *et al.*, 2010)

La subunidad Kir6.1, fue clonada a partir de islotes pancreáticos de rata. Se caracteriza por ser una proteína de 424 aminoácidos con dos segmentos putativos transmembranales (Inagaki, 1995). En cuanto a la subunidad Kir6.2 esta fue clonada a partir de material genómico de humano, es una proteína de 390 aminoácidos, igualmente con dos segmentos putativos transmembranales y la cual se ha localizado en el páncreas, el corazón, el músculo esquelético y el cerebro (Suzuki y Fujikura, 1997).

2.6.2 Subunidades SUR

La subunidad SUR1 también es conocida como receptor de alta afinidad a las sulfonilureas. Fue clonada a partir de material de una genoteca de cDNA. Tiene un tamaño de 177 kDa y está formada por 1582 aminoácidos. Está constituida por 17 segmentos putativos transmembranales (Tusnády, 1997) y dos pliegues de unión de nucleótidos, lo que indica su naturaleza reguladora (Walker, 1982). Se expresa en altas cantidades tanto en páncreas como en cerebro de rata (Inagaki, 1995).

La subunidad SUR2 también es conocida como un receptor de sulfonilureas de baja afinidad. Dicha subunidad fue clonada a partir de cerebro e islotes de corazón de rata (Inagaki, 1996). Está formado por 1545 aminoácidos, con un peso aproximado de 174 kDa. Al igual que SUR 1, se constituye de 17 segmentos

transmembranales putativos (Tusnády, 1997). Se han identificado dos variantes de SUR2: SUR2A y SUR2B (Chutkow, 1996). SUR2A se expresa principalmente en el músculo esquelético y corazón (Isomoto, 1996).

2.7 Los canales de K⁺ sensibles a ATP mitocondriales

Los canales de K⁺ sensibles a ATP mitocondriales ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$), se descubrieron en mitoplastos gigantes preparados a partir de mitocondrias de hígado de rata (Inoue *et al.*, 1991). Un año más tarde, Paucek y colaboradores (1992), los aislaron y purificaron parcialmente, y demostraron que estos canales tienen su función principalmente en el control del volumen de la matriz mitocondrial y no en la regulación de la actividad eléctrica como se había descrito para los canales de K_{ATP} de la membrana plasmática. Sin embargo, la estructura de las subunidades que constituyen el canal en la mitocondria es muy controversial y hasta el momento no se han obtenido resultados definitivos (Foster, 2008).

2.8 Composición molecular de los canales K_{ATP} mitocondriales

Se conoce actualmente que los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ son hetero-octámeros de dos tipos de subunidades, el canal rectificador entrante $\text{K}_{\text{ir}6.x}$ y el receptor a sulfonilureas SUR, unidos en tetrámeros $(\text{SUR}/\text{K}_{\text{ir}})_4$ para conformar el canal $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ funcional (Tricarico *et al.*, 2010). Esta hipótesis está sustentada por trabajos en los que se utilizaron anticuerpos específicos para $\text{K}_{\text{ir}6.1}$, los reconocen a una proteína de 51 kDa en preparaciones mitocondriales de la membrana

interna (Suzuki *et al.*, 1997). En contraposición, el pre-acondicionamiento isquémico (PCI) en corazones de ratones *knock-out* para las subunidades Kir6.1 y Kir6.2 se mantuvo intacta sugiriendo que estas subunidades no forman parte de los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ (Seharaseyon, 2000). Son precisamente este tipo de resultados los que dan paso a la discusión entre cuales son en realidad las subunidades que componen el canal $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$.

La posibilidad de que un receptor SUR pueda constituir este canal se sostiene con base en diversos reportes que muestran que las membranas mitocondriales presentan sitios de baja unión a sulfonilureas y por la presencia de una proteína de 63 kDa con esas características de unión (Grover, 2000).

2.9 Regulación farmacológica de los canales K_{ATP}

Desde el descubrimiento de estos canales, diversos trabajos se han enfocado a definir sus propiedades electrofisiológicas y su farmacología, incluyendo sus propiedades biofísicas a nivel de canal unitario, la regulación por los nucleótidos y su respuesta a abridores y bloqueadores de estos canales. Es precisamente que mediante el uso de diversos agonistas y antagonistas de los canales K_{ATP} (Garlid *et al.*, 1996; McCullough *et al.*, 1991) se ha tratado de explicar el impacto funcional del canal en el interior de la célula (Szewczyk y Wojtczak, 2002; Szewczyk *et al.*, 2006).

Algunos estudios han revelado que los canales $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ y los $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ se activan por pinacidil (Hanley *et al.* 2002) y son inhibidos por la glibenclamida (Paucek *et al.*, 1992; Garlid *et al.*, 1997). Sin embargo, el 5- hidroxidecanoato (5-

HD) y el diazoxido son más específicos para el canal $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ (Garlid *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1998). Otros de los agonistas de los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ son el diazoxido, el nicorandil y el BMS-191095) (Grover *et al.*, 2001). Adicionalmente, aunque se han usado otros agonistas del K_{ATP} entre ellos el cromakalim (Andrukhiv *et al.*, 2006), levcromakalim (Forestier *et al.*, 1996), para explorar su acción sobre el $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, estos son considerados como fármacos no selectivos para este canal. Estas diferencias en cuanto a su respuesta a los fármacos han permitido concluir que estos dos canales son entidades diferentes (Hibino *et al.*, 2010).

En particular, el nicorandil es un fármaco que actúa a nivel mitocondrial donde activa al $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ (Sato *et al.*, 2000). En el músculo esquelético protege del daño por reperfusión e isquemia (Cahoon *et al.*, 2013). El nicorandil posee un nitrato orgánico y un grupo nicotinamida, en su estructura química, que le confiere propiedades de donador de NO y de antioxidante (Reveaud *et al.*, 2009). El uso de bajas dosis de nicorandil reduce la oxidación de los componentes del K_{ATP} oxidados (oxidación de los grupos tiol del canal que conllevan a su inactividad) restaurando así la actividad del canal (Lu *et al.*, 2006).

Por otro lado, en lo que respecta al 5-HD, su acción ha sido explorada en las fibras musculares esqueléticas rápidas de ratón (García *et al.*, 2009), y en mitocondrias aisladas del músculo esquelético (Skalska *et al.*, 2005; Montoya-Pérez *et al.*, 2010). Sin embargo, el rango de concentraciones en que se han observado efectos inhibitorios por 5-HD es de un rango muy amplio que van desde los 40 μM a 1 mM en mitocondrias derivadas de diversos tejidos como el músculo cardiaco, el músculo esquelético, hígado, riñón, cerebro, músculo liso y en células

endoteliales (Szewczyk *et al.*, 2006). En la Tabla 1 se muestran diferentes abridores y bloqueadores de los canales K_{ATP} .

Tabla 1. Selectividad de los abridores e inhibidores de los canales $mitoK_{ATP}$, $sarcoK_{ATP}$ (Modificada de O'Rourke 2004).

	$mitoK_{ATP}$	$sarcoK_{ATP}$
K^+ abridores		
Diazoxido	√	A
Nicorandil	√	B
BMS-180448	√	C
BMS- 191095	√	
Cromakalim	√	√
EMD60480, 57970	√	√
Pinacidil	√	√
P-1060	√	√
P-1075	D	√
Minoxidil	√	√
KRN2391	√	√
Sildenafil	√	√
Isoflurano	√	√
Aprikalim	√	√
MCC-134		√
Levosimedan	√	√
K^+ bloqueadores		
5-Hidroxi-decanoato	√	E
MCC-134	√	
Glibenclamida, glipizida, glisoxepida	√	√
Glimeprida	F	√
HMR1098 (1883)	F	√

- Activa el $sarcoK_{ATP}$ en grandes concentraciones en presencia de altas concentraciones de ADP.
- Activa el $sarcoK_{ATP}$ en altas concentraciones.
- Es cardioprotector en concentraciones que no acorten el potencial de acción.
- Se consideraba selectivo para el $sarcoK_{ATP}$ pero tiene efecto sobre el $mitoK_{ATP}$ en mitocondrias aisladas.
- Inhibe el $sarcoK_{ATP}$ bajo condiciones de pH bajas.
- Bloquea el $sarcoK_{ATP}$ pero no inhibe la cardioprotección.

2.10 Papel de los canales K_{ATP} durante la fatiga

Los canales $sarcoK_{ATP}$ permanecen inactivos durante el reposo y en cambio son activados durante la fatiga (Light *et al.*, 1994). Incluso se sugiere que la activación del canal $sarcoK_{ATP}$ contribuye a la disminución de la fuerza tetánica y de

la tensión (Duty y Allen, 1995; Gong *et al.*, 2003). Al inhibirse estos canales con glibenclamida, en el músculo esquelético lento fatigado, nuestro grupo encontró un incremento de la fuerza, es decir, el músculo se recupera de la fatiga (Andrade *et al.*, 2011). El probable mecanismo de participación del canal $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ durante la fatiga se describe a continuación. El canal es activado cuando descienden los niveles de ATP y cuando se incrementan los niveles de ADP y H^+ . La salida de K^+ incrementa la concentración en el exterior. Como consecuencia, la membrana se hiperpolariza y se inactivan los canales de Na^+ reduciendo el sobretiro del potencial de acción. Con estos efectos disminuye la liberación de calcio por el retículo sarcoplásmico, disminuye la tensión desarrollada por el aparato contráctil, hay menos activación de puentes cruzados, menos actividad de la miosina ATPasa y por lo tanto, hay preservación del ATP (Figura 8) (Andrade *et al.*, 2011).

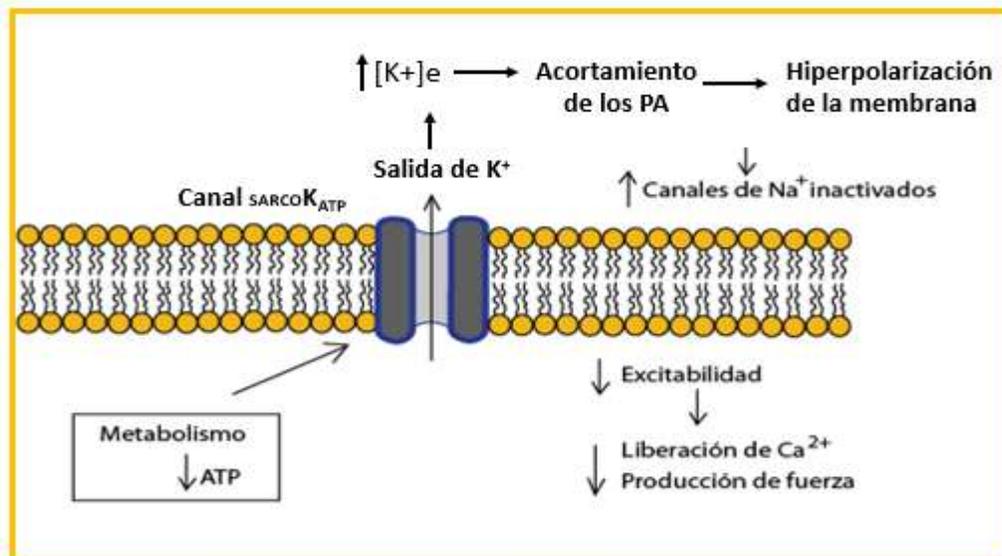


Figura 8. Posible mecanismo de participación del canal $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ en el músculo esquelético. El canal es activado cuando descienden los niveles de ATP, la membrana se hiperpolariza y se reduce la excitabilidad de la fibra muscular y por lo tanto de la contracción muscular (Andrade *et al.*, 2011).

Respecto al canal $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ como ya se mencionó anteriormente, su función principalmente en el control del volumen de la matriz mitocondrial y no en la

regulación de la actividad eléctrica como se había descrito para los canales de K_{ATP} de la membrana plasmática. La activación de estos canales $mitoK_{ATP}$ se considera una parte importante de la señalización celular que conduce a la producción de ATP y el volumen mitocondrial aumenta debido a la actividad de este canal bajo condiciones fisiológicas, cuando la respiración es inhibida (como ocurre durante la isquemia o la fatiga) (Kowaltowski *et al.*, 2001; Montoya *et al.*, 2011).

La regulación de la producción de ATP en la mitocondria y las rutas de señalización están involucradas en la protección del músculo a la isquemia y/o a la fatiga. Los canales $mitoK_{ATP}$ juegan un papel crucial en el origen y la transmisión de las señales de protección. Garlid y Paucek (2003) propusieron rutas endógenas de señalización a través de estos canales para mantener el volumen de la mitocondria vía la entrada de K^+ . Un primer acercamiento a la investigación de estas rutas de señalización ha sido reportado recientemente por Sánchez-Duarte *et al.* (2012).

Como ya se mencionó anteriormente, este canal regula el volumen de la matriz mitocondrial. La entrada de K^+ a la matriz por difusión debida a un alto gradiente electroquímico o por la apertura de los canales $mitoK_{ATP}$, está acompañada de la entrada de agua, causando un aumento del volumen mitocondrial. El eflujo de K^+ está regulado por el intercambiador K^+/H^+ , entrando H^+ y saliendo K^+ para mantener la homeostasis del volumen de la matriz. Normalmente, los canales $mitoK_{ATP}$ son inhibidos por ATP, ADP o ésteres de acetil-CoA, los cuales requieren de la presencia de cationes divalentes, como el Mg^{2+} ,

para poder actuar. La disminución de ATP durante la isquemia produciría la apertura de los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. Como consecuencia de un mayor influjo de K^+ tendría lugar un aumento de la turgencia de la matriz que conduciría a un incremento de la respiración a través de la cadena transportadora de electrones y a un aumento de la síntesis de ATP. La despolarización de la membrana como resultado de la entrada de K^+ reduciría la entrada de Ca^{2+} al interior de la mitocondria disminuyendo la sobrecarga de Ca^{2+} (Figura 9) (Halestrap, 1989).

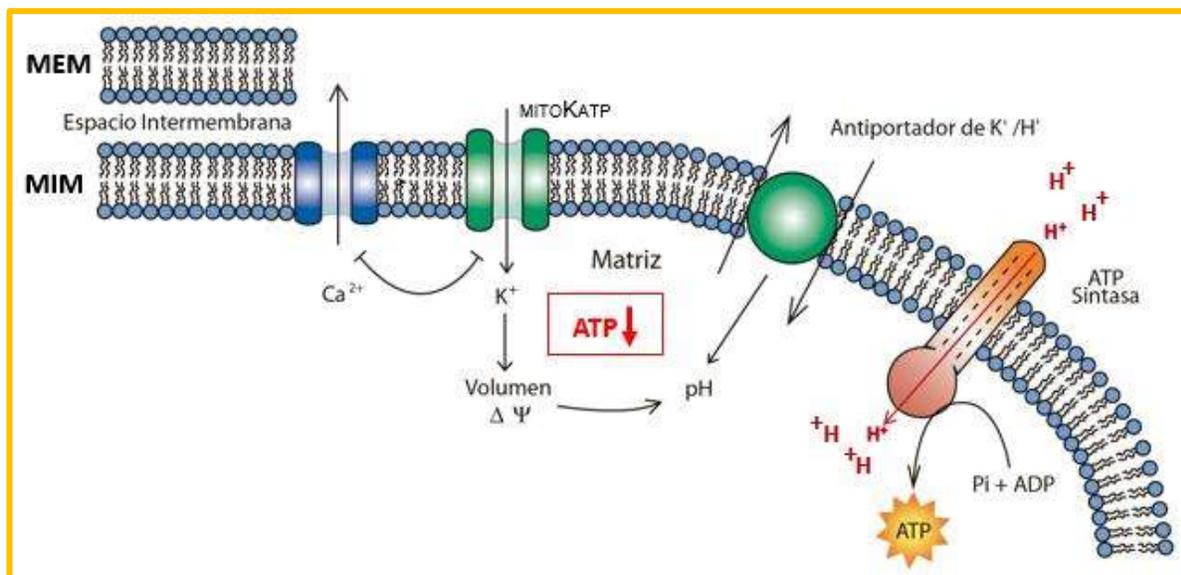


Figura 9. Rutas de señalización intramitocondrial en la activación del $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$.

La entrada de K^+ a la matriz por la apertura de los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, está acompañada de la entrada de agua, causando un aumento del volumen mitocondrial que conduciría a un incremento de la respiración a través de la cadena transportadora de electrones y a un aumento de la síntesis de ATP (Elaborado con información de Costa y Garlid, 2008).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es claro que las enfermedades crónico-degenerativas tienen un gran impacto social, económico y sobre todo de salud. Uno de los síntomas que constantemente manifiestan las personas que padecen DM es la fatiga, que se concibe como la falla en el mantenimiento de la producción de energía. Es claro que al no contar con la energía suficiente el sistema músculo-esquelético se verá disminuido en sus posibilidades de movimiento. El estudio de los procesos involucrados en el desarrollo de la fatiga muscular, ofrecen perspectivas importantes para mejorar la calidad de vida de los pacientes que presentan dicha enfermedad. Debido a los reportes que vinculan la actividad de los canales $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ y $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ con la recuperación de la tensión en el músculo fatigado, es importante determinar si existe una alteración en el funcionamiento y en la expresión de estos canales en el músculo esquelético debido al desarrollo de la DM.

IV. HIPÓTESIS

La función y la expresión de los canales $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ y $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ en el músculo esquelético disminuyen en la fatiga asociada a la *diabetes mellitus*.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la función y la expresión de los canales $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ y $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ en la resistencia a la fatiga asociada a DM en el músculo esquelético.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar la participación de los canales K_{ATP} sobre la fatiga en el músculo esquelético de ratas diabéticas.
- 2.- Determinar el efecto de la DM y su tratamiento con fármacos normoglucemiantes sobre los niveles proteicos de los canales $sarcoK_{ATP}$ y $mitoK_{ATP}$ en el músculo esquelético.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Material biológico

Se utilizaron ratas macho Wistar de aproximadamente 300-350 g, las cuales se dividieron en 5 diferentes grupos: control (C), diabético (D), diabético tratado con insulina (D+I) y diabético tratado con nicorandil (D+N). Para inducir la diabetes se suministró una dosis de 55 mg/kg de estreptozotocina vía intraperitoneal (Kubasov *et al.*, 2014). Una semana posterior a dicha dosis se realizaron mediciones de niveles de glucosa sanguínea utilizando un glucómetro Accu Check Performa® para corroborar el desarrollo de la diabetes mellitus.

7.2 Disección de los músculos

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo el músculo sóleo, el cual se colocó en una caja de Petri con fondo de resina transparente donde se fijó con ayuda de alfileres entomológicos para posteriormente retirarle el exceso de tejido graso y conectivo. El músculo constantemente estaba siendo bañado por solución Krebs-Ringer, además de que también estaba el músculo expuesto a gas carbónico (95 % de CO_2 y 5 % O_2) todo lo anterior con la

finalidad de mantener viable el músculo para los registros de tensión isométrica *ex vivo*.

7.3 Protocolo de estimulación de los músculos

Se utilizaron los músculos sóleos. Los procedimientos de manejo de animales y su mantenimiento en el bioterio se llevaron a cabo de acuerdo con la guía y norma para el cuidado de animales de experimentación de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

Los animales fueron sacrificados usando procedimientos descritos previamente. Se extrajo el músculo, se colocó en una caja de Petri revestida con fondo de resina transparente (Sylgard). El músculo fue fijado mediante alfileres entomológicos al fondo de la cámara inmerso en solución Krebs-Ringer (118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.18 mM MgSO₄, 24.8 mM NaHCO₃, 1.18 mM KH₂PO₄, 10 mM Glucosa, 2.54 mM CaCl₂) (Steward *et al.*, 2011). Bajo el microscopio estereoscópico se retiró el exceso de tejido conectivo y se montó el músculo en una cámara para el registro de la tensión isométrica, con su extremo proximal sujeto al fondo de la cámara y el extremo distal al gancho de un transductor óptico (Grass FT03), el cual a través de un amplificador CyberAmp 320 y de una interfase analógico-digital (Digidata 1322A) que permitió adquirir la tensión generada por el músculo en una computadora, mediante el software Axoscope (Axon Instruments, USA). Posteriormente, se aplicó el protocolo para inducir la fatiga mediante estimulación eléctrica repetitiva (pulsos de 100 V, 300 ms, 45 Hz).

Antes de proceder al registro de tensión isométrica, el músculo fue estirado 1.3 veces su longitud de reposo y se dejó en perfusión en la solución fisiológica por espacio de 30 min. Al inicio de cada experimento se registró una contractura inducida por 80 mM de K⁺ por 4 min a fin de conocer el estado del músculo ya que este tipo de contractura está bien caracterizado (Huerta *et al.*, 1986). Obtenida la tensión basal al inicio del experimento, se estimuló al fascículo hasta que la tensión se redujo en ≈60 % respecto a la tensión inicial. En ese momento, se aplicaron de manera separada cada uno de los fármacos de estudio durante 6 min para observar su efecto. Posteriormente, se retiró el fármaco mediante lavados con la solución fisiológica y se observó el comportamiento del músculo. Se tomaron medidas de la tensión máxima (tensión al pico de la sacudida) y la tensión total (área bajo curva) que incluye la tensión máxima desarrollada y la relajación. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente entre 22 y 24 °C. Además de ello durante todo el ensayo el músculo estuvo en solución fisiológica que contenía gas carbógeno (descrito previamente), todo esto con el fin de preservar en buen estado los músculos.

7.4 Protocolos de aislamiento de mitocondrias

Los músculos se fraccionaron en secciones de aproximadamente 1mm, se realizaron varios lavados con el fin de retirar el exceso de sangre, se les agregó tripsina, esto para ayudar a extraer una mayor cantidad de mitocondrias intrafibrilares. Posteriormente, se colocaron en un tubo homogenizador con medio 1 de aislamiento previamente enfriado a 4 °C, esto para tratar de mantener en buen estado las mitocondrias. La homogenización se realizó con ayuda de un

pistón de teflón el cual se sujetó a un taladro, a fin de facilitar el deshacer la estructura fibrosa del músculo con mayor rapidez y eficacia y con ello favorecer que la tripsina penetrara hasta las miofibrillas más internas para permitir la extracción de las mitocondrias.

Después de realizar la homogenización, el tejido se sometió a centrifugación diferencial con el fin de ir eliminando tejido y partículas de mayor tamaño hasta obtener solo las mitocondrias de acuerdo al siguiente protocolo de aislamiento: el homogenado se colocó en tubos de centrifuga y se aforaron a $\frac{3}{4}$ partes con su respectivo medio 1 de aislamiento (KCl 180 mM, EDTA- Na_2 10 mM. Se ajustó el pH a 7.4 (Skalska *et al.*, 2005) y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min. Se almacenó el sobrenadante y el tejido se resuspendió, aforando los tubos a $\frac{3}{4}$ partes para ser centrifugados nuevamente ahora a 3500 rpm por 10 min, el sobrenadante se colocó en otro tubo junto con el sobrenadante producto de la centrifugación de 2500 rpm, es decir los dos sobrenadantes resultantes de las centrifugaciones de 2500 y 3500 rpm se mezclaron y se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se le agregó albumina, se dejó reposar por 10 min posteriormente, se resuspendió el precipitado en 10 ml de medio y se centrifugó a 9000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla final se resuspendió suavemente, con ayuda de un pincel, en aproximadamente 1 ml de medio 2 (KCl 180 mM, MgCl_2 5 mM, el pH se ajustó a pH de 7.4.

7.5 Purificación de las mitocondrias

Una vez extraídas las mitocondrias se procedió a realizar la purificación de las mismas. Primero, utilizando un gradiente de Percoll al 23 % y centrifugando a 19900 rpm durante 15 min a 6 °C, enseguida se extrajeron las mitocondrias con ayuda de una pipeta Pasteur y se colocaron en tubos aforados a $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad con su respectivo medio y se centrifugaron nuevamente pero ahora a 14000 rpm durante 10 minutos a 6 °C, posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla suavemente con ayuda de un pincel, se aforaron los tubos a $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos a 6 °C, finalmente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla suavemente con ayuda de un pincel en un volumen de 1ml aproximadamente de su respectivo medio. Una vez obtenida la pastilla final, en la que solo se obtuvieron mitocondrias purificadas se determinó la cantidad de proteína utilizando el método de Biuret (Gornal *et al.* 1984). Posterior a ello, se agregaron 25 µl/ml de inhibidor de proteasa a cada muestra y se almacenaron en tubos Eppendorf a -80 °C.

7.6 Determinación de la concentración de proteína

Para determinar la concentración de proteína de los homogenados totales y de la fracción mitocondrial se utilizó el método de Biuret (Gornal *et al.*, 1984). Las lecturas de las muestras se realizaron en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18 a una longitud de onda de 520 nm, usando un blanco para ajustar el aparato y la curva de calibración se realizó empleando albúmina sérica bovina. Dichos datos fueron procesados para determinar la concentración.

7.7 Western Blot

7.7.1 Electroforesis de proteínas

La inmunodetección se realizó de acuerdo al protocolo de Laemmli (1970) y Tobwin *et al.*, (1979). Los geles se prepararon a una concentración del 13, 10 y 8 %, esto de acuerdo a la proteína de interés, los cuales a su vez estaban conformados en dos partes: el separador (acrilamida/bisacrilamida 30 %, Tris 1.5 M pH8.8, agua desionizada, SDS 10 %, TEMED y persulfato) el cual permite que las proteínas se separen de acuerdo a su peso molecular y el concentrador (acrilamida/bisacrilamida 30 %, Tris 0.5 M pH 6.8, agua desionizada, SDS 10 %, TEMED y persulfato) el cual permite que las proteínas se empaqueten previo al entrar al separador. Las diferentes muestras se prepararon colocando en tubos eppendorf: la proteína de interés, agua desionizada y buffer de carga BS4X (Tris/HCl 0.5 M, SDS 8 %, glicerol 40 %, 2-mercaptoetanol 20 %, Azul de bromofenol, H₂O cbp 5 ml) en las cantidades correspondientes, y posterior a ello se colocaron en baño María por 3 min, esto para favorecer la desnaturalización de las proteínas por acción del BS4X. Los geles se colocaron en la cámara de electroforesis con buffer de corrida (Tris, glicina, SDS) tanto en el espacio entre ambos geles como por fuera de los mismos. Se cargaron 25 µl (40 µg de proteína de acuerdo a los datos de las lecturas por método de Biuret) de cada una de las muestras previamente preparadas en su carril correspondiente en los geles con ayuda de una jeringa Hamilton. Además, también se cargó el marcador de peso molecular Mini-PROTEAN (Bio-Rad) de bajo rango para medición de proteínas que van desde los 97 a los 14 kDa (97 kDa fosforilasa b, 66 kDa albúmina sérica,

45 kDa ovoalbúmina, 31 kDa anhidrasa carbónica, 21 kDa inhibidor de tripsina, 14 kDa lisozima). Las muestras se corrieron a 100 V por espacio de 1 h, aproximadamente.

7.7.2 Transferencia de proteínas

Una vez finalizada la electroforesis de proteínas se inició la transferencia, para lo cual se utilizó membrana de PVDF, la cual previamente a la transferencia se hidrato sumergiéndola en metanol, posteriormente en agua desionizada y finalmente en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %). Se prepararon los cassettes de transferencia colocando esponja/ papel filtro/ gel/ membrana/ papel filtro/ esponja (todo estuvo impregnado con buffer de transferencia). Se colocaron los cassettes en la cámara de transferencia, con buffer de transferencia en su interior, y se ésta se llevó a cabo a 100 V por espacio de 1 h aproximadamente. Transcurrido el tiempo se extrajo la membrana y se colocó en leche al 5 %, al menos por 1 h, esto con la finalidad de bloquear sitios inespecíficos, para su posterior inmunodetección.

7.8 Inmunodetección

7.8.1 Incubación con anticuerpos

Posterior al bloqueo de sitios inespecíficos se desechó la leche y se realizaron 3 lavados a la membrana por espacio de 5 min cada uno con TBS-Tween 20 (Tris/HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05 %) para retirar el

exceso de leche. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-K_{ir}6.2(SC-20808, Santa cruz), anti-K_{ir}6.1 (SC-20809, Santa cruz), diluidos a una proporción de 1:2000, al menos durante 1 h en agitación constante. Transcurrido el tiempo se desechó la leche con anticuerpo primario y se realizaron nuevamente 3 lavados a la membrana con TBS-Tween 20 por 5 min cada uno para retirar el exceso anticuerpo primario. Una vez realizado esto, la membrana se incubó con el anticuerpo secundarios SC-2313, Santa cruz o SC-2020, Santa cruz según correspondiera, diluido en una proporción de 1:4000 al menos durante 1 h también en agitación constante. Nuevamente se desechó la leche con anticuerpo secundario y se lavó la membrana 3 veces por 10 min con TBS-Tween 20 para retirar exceso de anticuerpo secundario.

Finalmente, se colocó la membrana en una caja con solución de quimioluminiscencia y se cubrió con la misma a la membrana por espacio de 30 s. Se colocó la membrana en el cassette de revelado y encima se colocó la placa de rayos X, esto último para la posterior observación de resultados. Enseguida se colocó la placa en la solución reveladora por 2 min, después en la solución fijadora por 3 min y finalmente en agua para retirar el exceso de esta última.

VIII. RESULTADOS

Para corroborar el desarrollo de la DM en las ratas que les fue suministrada la estreptozotocina, se evaluaron diferentes parámetros que son indicativos de la enfermedad, como lo es el nivel de glucosa sanguínea (mg/dl, Figura 10), así como el peso corporal (g, Figura 11). Las mediciones se realizaron durante seis semanas. Las primeras cuatro semanas, fueron en ausencia de tratamientos según correspondiera de acuerdo al grupo, mientras que las dos últimas semanas fueron durante la administración de los respectivos tratamientos.

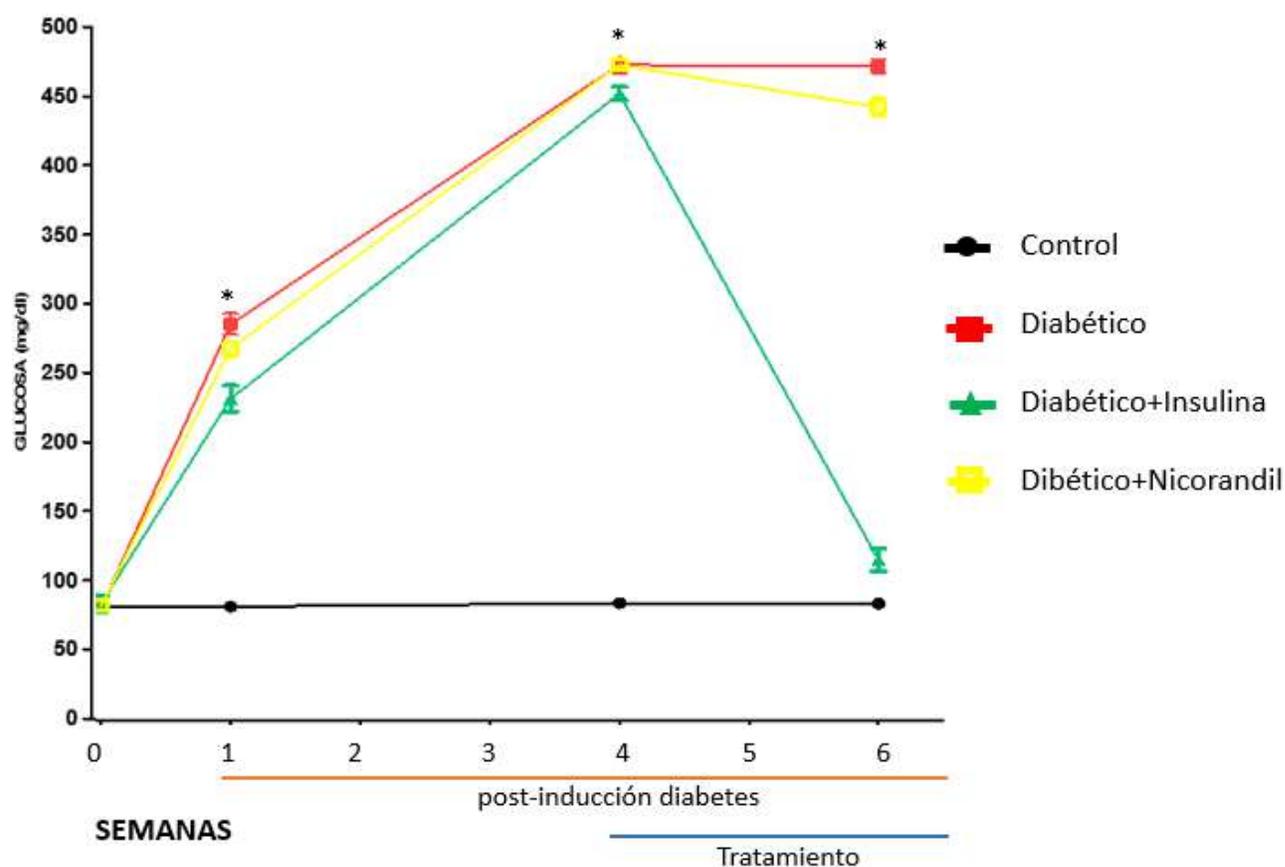


Figura 10. Niveles de glucosa sanguínea en los diferentes grupos de ratas. La línea roja y azul en el eje X indica las mediciones en las semanas posteriores a la inducción de la DM y durante las semanas de tratamiento respectivamente. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de $n=9$. $p < 0.05$ vs. control, t -Student.

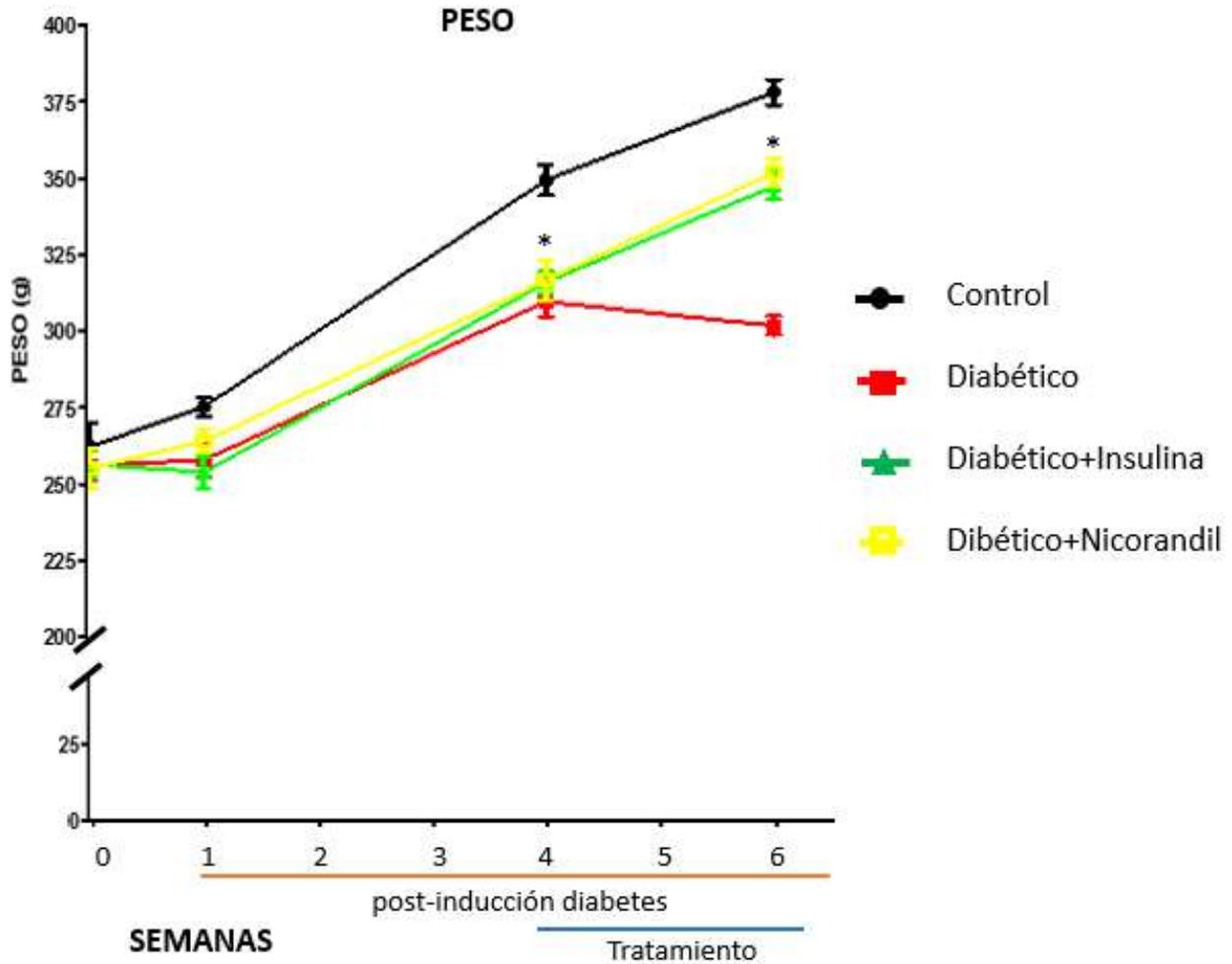


Figura 11. Peso de los diferentes grupos de ratos. La línea roja y azul en el eje X indica las mediciones en las semanas posteriores a la inducción de la DM y durante las semanas de tratamiento respectivamente. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de $n=9$. $p < 0.05$ vs. control, t -student.

8.1 Registros de tensión Isométrica

Con el objetivo de comparar si existían diferencias en el tiempo de fatiga entre los diferentes grupos procedimos a registrar y evaluar el tiempo en el que se estableció la fatiga muscular mediante la implementación del protocolo de

estimulación durante los registros de tensión isométrica. Es importante señalar que los tiempos se registraron antes de agregar cualquiera de los fármacos que se utilizaron *ex vivo*. Los resultados se pueden apreciar en la Figura 12, donde se observa que el grupo control presentó un tiempo de resistencia de 463 ± 13.22 s. Para el caso del grupo diabético fue de 226.5 ± 10.81 . Por otro lado, para el grupo diabético tratado con insulina el valor fue de 277.5 ± 13.25 s. Finalmente, el grupo diabético tratado con nicorandil fue el que presentó un mayor tiempo de establecimiento de la fatiga muscular con un valor de 873 ± 52.06 s.

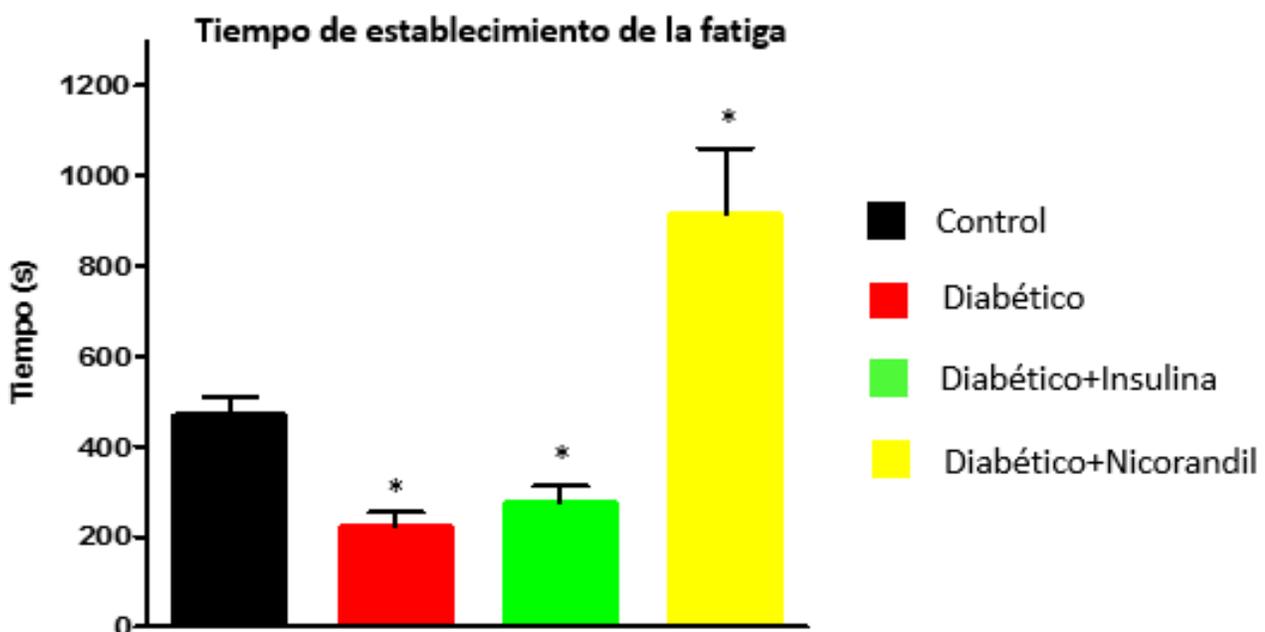


Figura 12. Tiempo de establecimiento de la fatiga muscular en los diferentes grupos. El grupo D mostró un menor tiempo de resistencia al establecimiento de la fatiga muscular respecto al grupo C. Por el contrario, el grupo D+N fue el que mostró un mayor tiempo de resistencia. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de $n=9$. $p<0.05$ vs. control, *t*-Student.

8.1.1 Efecto de la glibenclamida y del pinacidil sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de rata

En nuestro grupo de trabajo, previamente se caracterizó la participación de los canales K_{ATP} en el proceso de la fatiga muscular (Andrade *et al.*, 2009). Con el fin de obtener información adicional se estudió el efecto de la glibenclamida (150 μ M) sobre la tensión post-fatiga en fibras lentas del músculo esquelético de rata. En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos para el grupo control, donde se puede apreciar la contracción control normalizada al 100%, y la inducción de la fatiga muscular donde hubo una reducción del 60-70 % de la contracción control. Posteriormente, al bloquear los canales K_{ATP} con glibenclamida (150 μ M) se observó una recuperación de la tensión post-fatiga del 83 ± 14.05 % en comparación de la condición fatigada. Finalmente se realizó el lavado para retirar la glibenclamida se observó que el músculo se fatigo nuevamente.

Por otro lado, la Figura 14 muestra los resultados obtenidos del efecto del pinacidil (200 μ M) sobre la tensión post-fatiga en fibras lentas del músculo esquelético de rata en el grupo control. Se observa la contracción control normalizada a 100%, posteriormente se realizó la inducción de la fatiga muscular provocando una reducción del 60-70 % de la contracción control mediante el protocolo de estimulación. Se aprecia también que al agregar el pinacidil no hubo recuperación de la tensión post-fatiga en comparación de la condición fatigada. Finalmente, durante la etapa de lavado tampoco se registraron cambios en la tensión desarrollada.

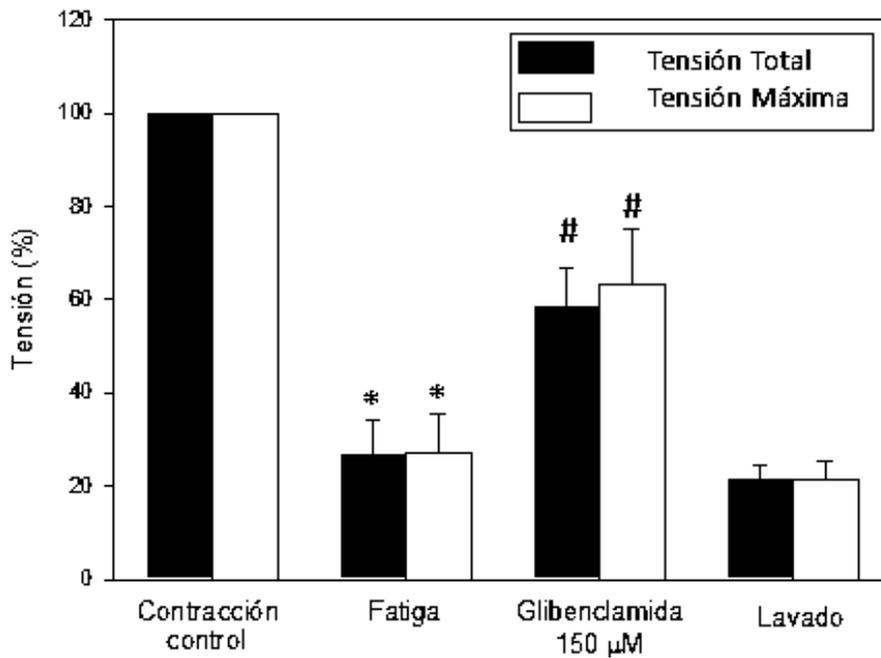


Figura 13. Efecto de la glibenclamide sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas control. Se normalizo a 100% la contracción control, se indujo la fatiga por estimulación eléctrica repetitiva, se agregó la glibenclamide por 6 minutos y posteriormente se retiró mediante lavados (n=9; * $p < 0.05$ vs. Contracción control, # $p < 0.05$ vs. Fatiga, *t*-Student)

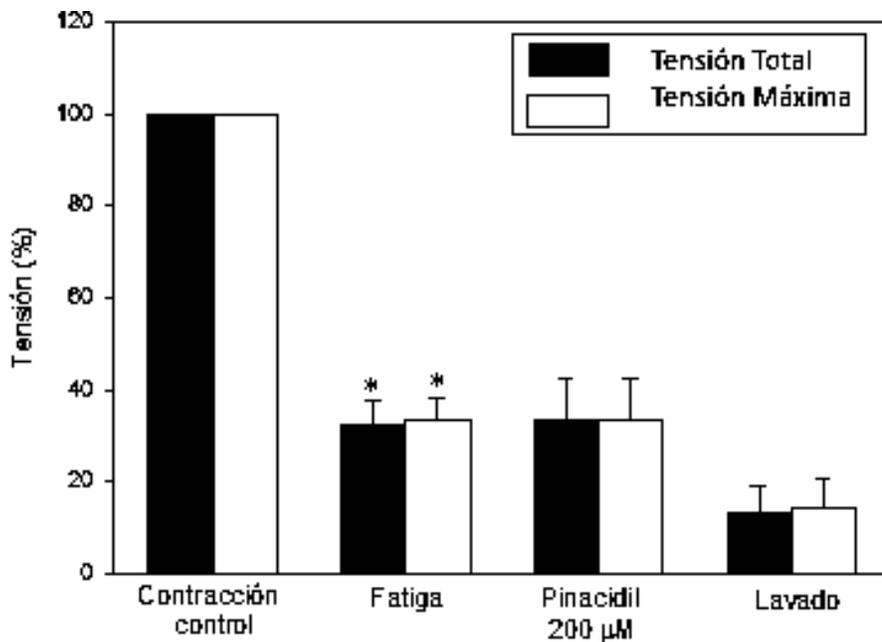


Figura 14. Efecto del pinacidil sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas control. Se normalizo a 100% la contracción control, se indujo la fatiga por estimulación eléctrica repetitiva, se agregó el pinacidil por 6 minutos y posteriormente se retiró (n=9; * $p < 0.05$ vs. Contracción control, *t*-Student)

8.1.2 Efecto de la diabetes sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas

En la presente serie experimental se exploró el efecto del desarrollo de la diabetes sobre la recuperación de la tensión post-fatiga en el músculo esquelético, para lo cual se probaron las mismas concentraciones de glibenclamida (150 μ M) y pinacidil (200 μ M) que fueron las utilizadas en los ensayos con el grupo control. Se muestra en la Figura 15 la contracción control que se estandarizó a 100%, se siguió estimulando el músculo para inducir la fatiga muscular provocando una disminución de 60-70 % de la contracción control, y cuando se bloqueó el canal con la glibenclamida se puede apreciar que no hubo recuperación de la tensión, misma situación que se presentó en la fase de lavado.

En contra parte, también se exploró el efecto del pinacidil (200 μ M) sobre la tensión pos-fatiga en un modelo de músculo diabético, los resultados se muestran en la Figura 16, donde se muestran la contracción control estandarizada al 100%, posteriormente la inducción de la fatiga muscular ya que hubo una reducción de 60-70% de la contracción control, de igual modo que en el caso de la glibenclamida en el mismo modelo de diabetes, se puede apreciar que no hubo recuperación de la tensión en presencia del pinacidil en la dosis anteriormente mencionada. Durante la etapa de lavado se observa que hubo incluso un menor desarrollo de tensión

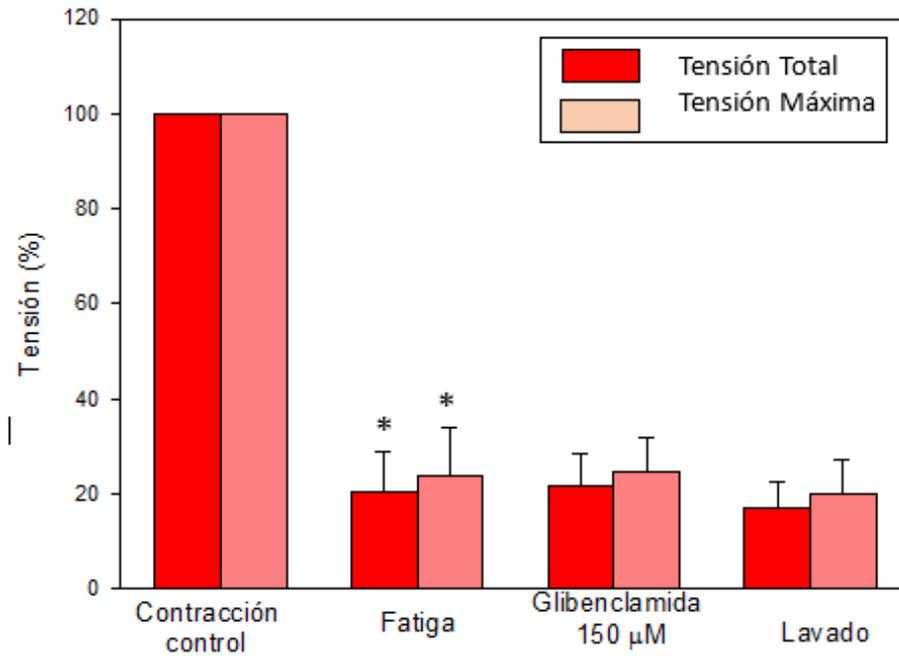


Figura 15. Efecto de la diabetes sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas. La contracción control se normalizo a 100%, se indujo la fatiga por estimulación eléctrica repetitiva, se agregó la glibenclamida por 6 minutos y posteriormente se retiró mediante lavados (n=9; * p < 0.05 vs. Contracción control, *t*-Student).

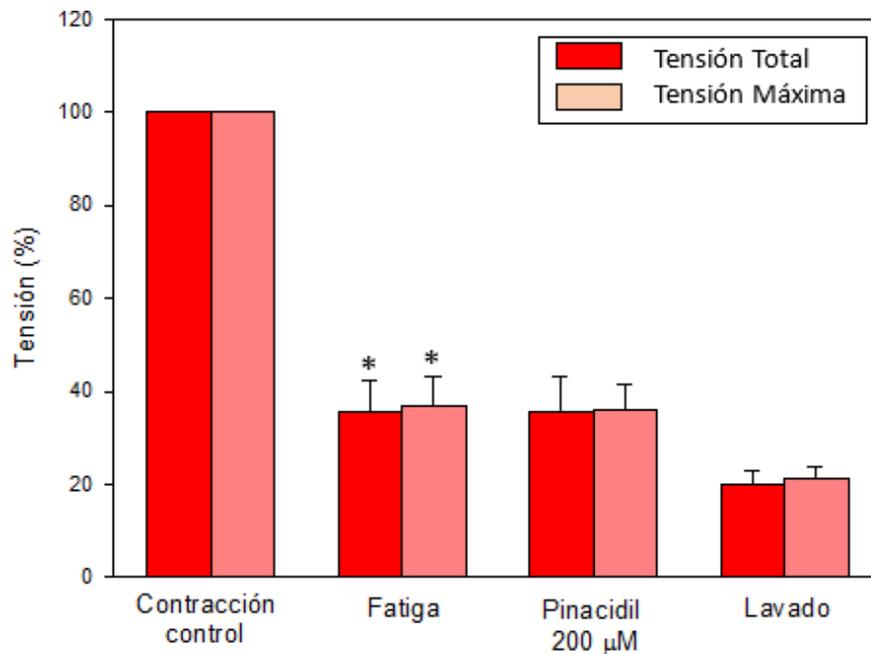


Figura 16. Efecto de la diabetes sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas. La contracción control se normalizo a 100%, se indujo la fatiga por estimulación eléctrica repetitiva, se agregó el pinacidil por 6 minutos y posteriormente se retiró mediante lavados (n=9; * p < 0.05 vs. Contracción control, *t*-Student)

8.1.3 Efecto del tratamiento de la diabetes con insulina sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas

Está bien documentado que la administración de insulina contribuye a normalizar los niveles de glucosa sanguínea en los modelos diabéticos, por lo tanto, se exploró el efecto del tratamiento de la diabetes con insulina sobre la tensión post-fatiga en fibras musculares lentas. Se puede apreciar en la Figura 17 la contracción control normalizada al 100%, y la inducción de la fatiga muscular donde hubo una reducción del 60-70 % de la contracción control. Posteriormente, al bloquear los canales K_{ATP} con glibenclamida (150 μM) se observó una recuperación de la tensión post-fatiga del 85 ± 11.45 % en comparación de la condición fatigada. Finalmente se realizó el lavado para retirar la glibenclamida se observó que el músculo no mostro cambios en la tensión desarrollada.

El suministro exógeno de insulina en un modelo de diabetes, también puede favorecer el adecuado funcionamiento del sistema contráctil de los músculos esqueléticos. La Figura 18 muestra los resultados obtenidos del efecto del pinacidil (200 μM) sobre la tensión post-fatiga en fibras lentas del músculo esquelético de rata en el grupo diabético tratado con insulina, Se puede apreciar primeramente la contracción control estandarizada a 100 %, una reducción del 60-70% de la contracción control y por tanto la inducción de la fatiga muscular, posteriormente al agregar el pinacidil no hubo recuperación estadísticamente significativa de la tensión post-fatiga en comparación de la condición fatigada. Durante la etapa de lavado se observa que hubo incluso un menor desarrollo de tensión.

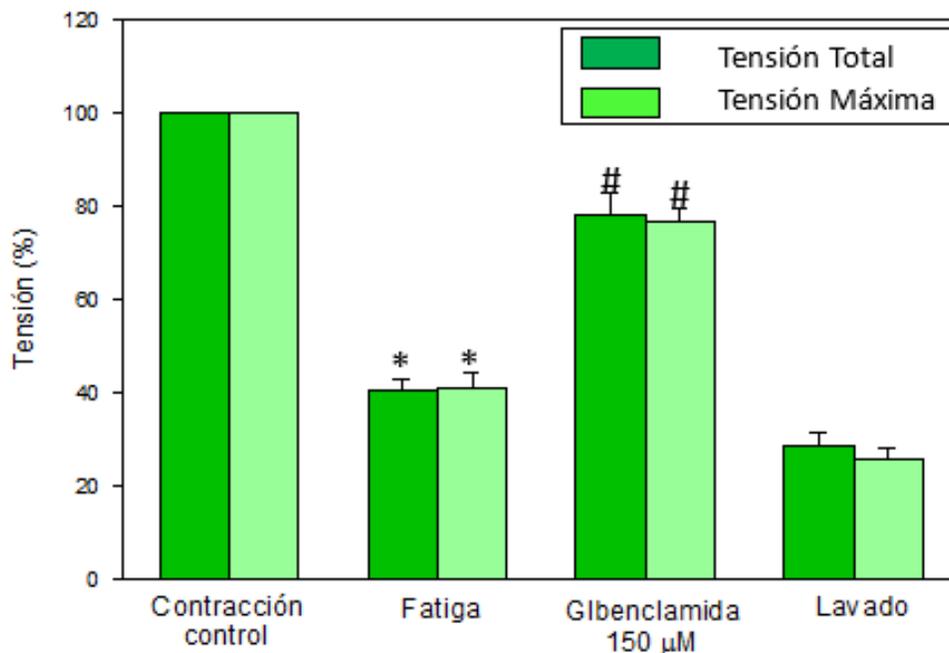


Figura 17. Efecto de la glibenclamida sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas diabéticas tratadas con insulina. La contracción control se normalizo a 100%, se indujo la fatiga por estimulación eléctrica repetitiva, se agregó la glibenclamida por 6 minutos y posteriormente se retiró mediante lavados (n=9; * p < 0.05 vs. Contracción control, # p < 0.05 vs. Fatiga, t-Student).

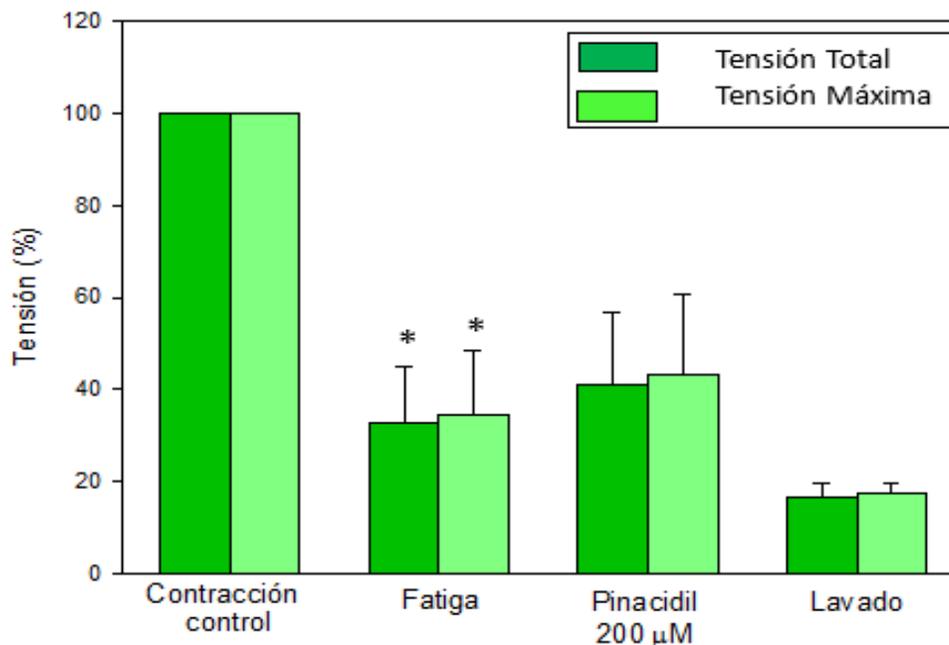


Figura 18. Efecto del pinacidil sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas diabéticas tratadas con insulina. La contracción control se normalizo a 100%, se indujo la fatiga por estimulación eléctrica repetitiva, se agregó el pinacidil por 6 minutos y posteriormente se retiró mediante lavados (n=9; * p < 0.05 vs. Contracción control, t-Student).

8.1.4 Efecto de la administración prolongada del nicorandil sobre la tensión de las fibras lentas del músculo esquelético diabético

El nicorandil, considerado a nivel mitocondrial un activador específico de los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ en células cardiacas (Sato *et al.*, 2000) y en el músculo esquelético (Cahoon *et al.*, 2013) induce un incremento en la tensión post-fatiga. En esta serie experimental se exploró el efecto de un tratamiento prolongado de nicorandil (5 mg/kg) con la finalidad de determinar la posible participación del canal $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ durante la tensión post-fatiga en el músculo esquelético lento de ratas diabéticas. La Figura 19 muestra los resultados obtenidos donde se puede observar la contracción control estandarizada a 100 %, la inducción de la fatiga muscular es decir una reducción del 60-70 % de la contracción control se logró mediante la implementación del protocolo de estimulación, posteriormente se observó una recuperación de la tensión post-fatiga de 79 ± 10.37 % en comparación de la condición fatigada al realizar el bloque de los canales K_{ATP} con la glibenclamida. Durante la fase de lavado nuevamente hubo una reducción de la tensión desarrollada.

Finalmente, la Figura 20 muestra la contracción control normalizada a 100%, la inducción de la fatiga muscular, es decir una reducción del 60-70% de la contracción control. Posteriormente, se observó una recuperación de la tensión post-fatiga en presencia del pinacidil (200 μM) de 37 ± 8.12 % en comparación de la condición fatigada. Durante la etapa de lavado hubo una nueva reducción de la tensión,

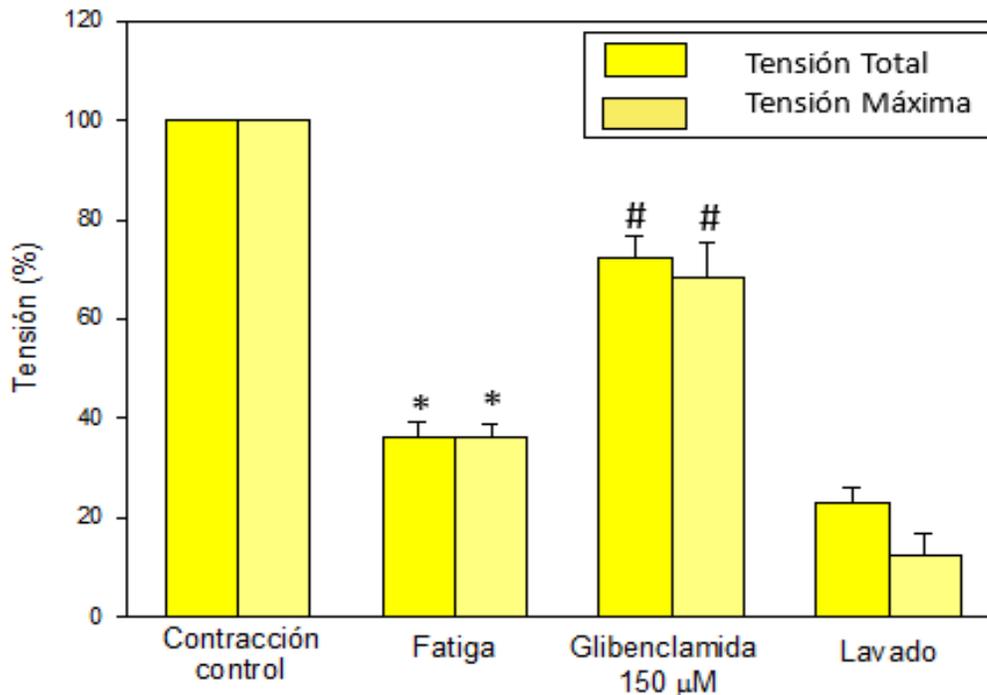


Figura 19. Efecto de la glibenclamida sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas diabéticas tratadas con nicorandil. La contracción control se normalizo a 100%, se indujo la fatiga por estimulación eléctrica repetitiva, se agregó la glibenclamida por 6 minutos y posteriormente se retiró mediante lavados (n=9; * p < 0.05 vs. Contracción control, # p < 0.05 vs. Fatiga, t-Student).

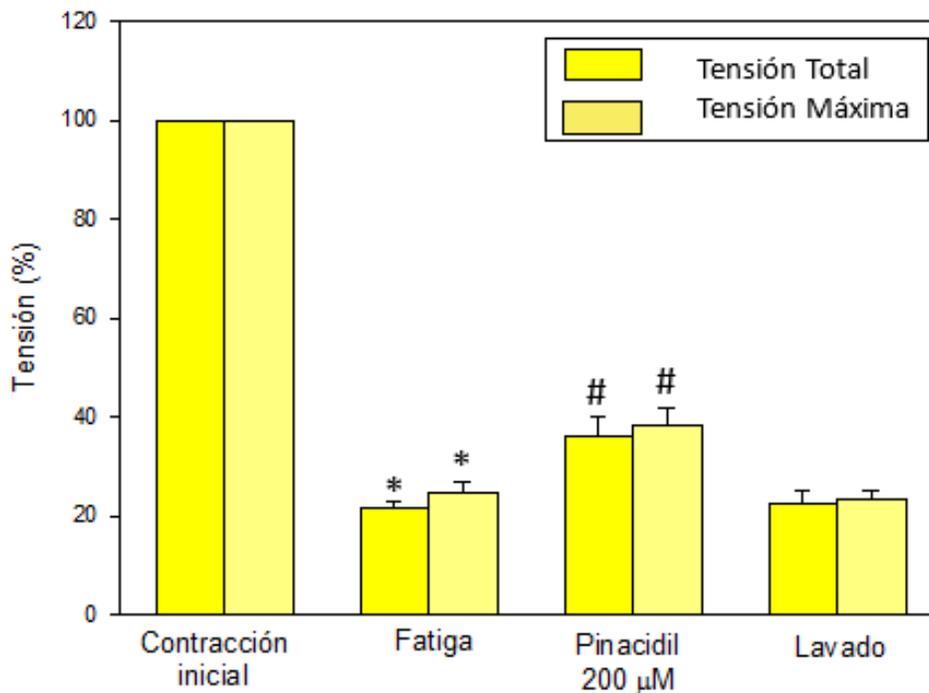


Figura 20. Efecto del pinacidil sobre la tensión post-fatiga de fibras musculares lentas de ratas diabéticas tratadas con nicorandil. La contracción control se normalizo a 100%, se indujo la fatiga por estimulación eléctrica repetitiva, se agregó el pinacidil por 6 minutos y posteriormente se retiró mediante lavados (n=9; * p < 0.05 vs. Contracción control, # p < 0.05 vs. Fatiga, t-Student).

8.2 Inmunodetección de las subunidades de los canales K_{ATP}

Para determinar la especificidad del anticuerpo se realizaron pruebas con el fin de asegurarnos que las señales no correspondían a falsos positivos, para ello las membranas se incubaron solo con los anticuerpos secundarios IgG-HRP acoplado a peroxidasa, Santa Cruz. En la Figura 21 se observa que la única señal obtenida corresponde al marcador y en cambio no observamos señal en las diferentes muestras, lo cual nos indica que los anticuerpos utilizados son específicos contra las proteínas $K_{ir6.x}$, con ello nos aseguramos que las señales obtenidas no se deben a inespecificidad de los anticuerpos secundarios utilizados.

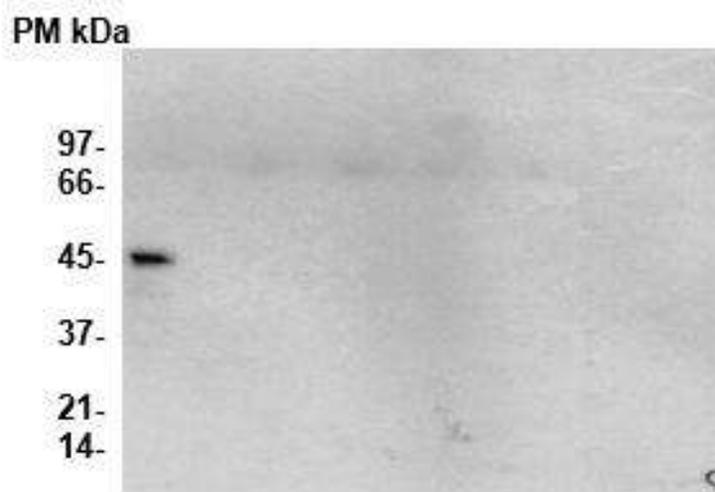


Figura 21. Prueba de especificidad de anticuerpo. Membrana incubada con anticuerpos secundarios IgG-HRP acoplado a peroxidasa, donde se aprecia señal de 45 kDa que corresponde solo al marcador de peso molecular, en cambio para las demás muestras no se observó señal alguna.

8.2.1 Subunidad Kir6.2

Previamente se había reportado por Zhin y colaboradores (2012) que la DM produce alteraciones sobre los niveles de los canales K_{ATP} en corazón, por lo tanto, procedimos a realizar ensayos de Western blot para evaluar alteraciones sobre la subunidad Kir 6.2 en el músculo esquelético. Adicionalmente también se evaluó cómo eran los niveles de los canales K_{ATP} cuando se trató a las ratas diabéticas con insulina, así como con nicorandil. La Figura 22 muestra los resultados obtenidos de la inmunodetección de la subunidad Kir6.2 en los homogenados totales del músculo esquelético de los diferentes grupos. En el panel A) se observa el perfil de las proteínas transferidas a membranas PVDF teñidas con rojo de Ponceau, en la cual puede apreciarse una carga uniforme en cada uno de los carriles. En el panel B) se muestra la placa de la inmunodetección empleando el anticuerpo específico para Kir6.2, en la cual observa la presencia de una banda de aproximadamente 45 kDa, que de acuerdo a lo reportado en la literatura corresponde a la subunidad Kir6.2. Se aprecian cambios en los niveles de dicha subunidad. Las muestras provenientes del grupo diabético y del grupo diabético que fue tratado con nicorandil presentaron disminución en los niveles de dicha subunidad respecto al grupo control. En cambio, el grupo diabético tratado con insulina mostró un incremento en comparación del grupo diabético, inclusive también mayor que el grupo control. Por otra parte, la Figura 23 se muestran los resultados del western blot en las fracciones mitocondriales, En el panel A) se observa el perfil de las proteínas transferidas a membranas PVDF teñidas con rojo de Ponceau, en la cual puede apreciarse una carga uniforme de las muestras. En el panel B) se muestra la placa de la inmunodetección empleando el anticuerpo

específico para Kir6.2, en la cual observa la presencia de una banda de aproximadamente 45 kDa, corresponde a la subunidad Kir6.2 según lo reportado en la literatura. De igual modo, se aprecia que existieron alteraciones en los niveles de dicha subunidad ya que el grupo diabético y el grupo diabético tratado con nicorandil presentaron una banda de menor intensidad, sobre todo este último, en comparación del grupo control. En cambio, el grupo diabético tratado con insulina mostró un incremento en comparación con el grupo control pero sobre todo que el grupo diabético.

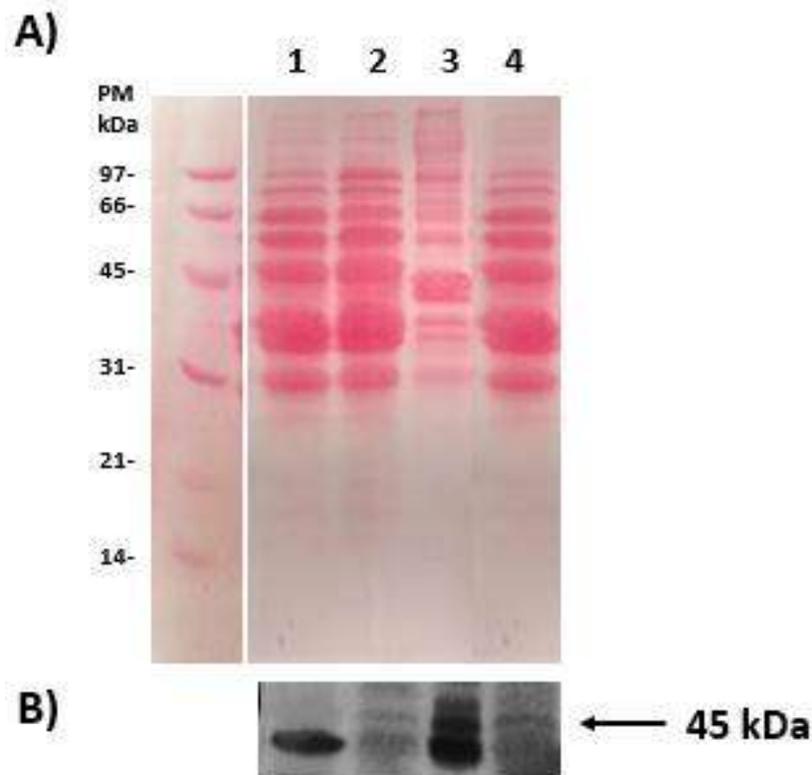


Figura 22. Inmunodetección de la subunidad Kir6.2 en homogenados totales. A) perfil de proteínas en membrana PVDF, B) Placa de la inmunodetección. Se cargaron 45 µg de proteína, se separaron por electroforesis por espacio de 1 h aproximadamente en geles de poliacrilamida al 15 %, la inmunodetección se realizó empleando el anticuerpo comercial anti-Kir6.2 (SC-20808, Santa cruz) a una dilución de 1:2000, la interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia. 1) grupo control, 2) grupo diabético, 3) grupo diabético+insulina, 4) grupo diabético+nicorandil.

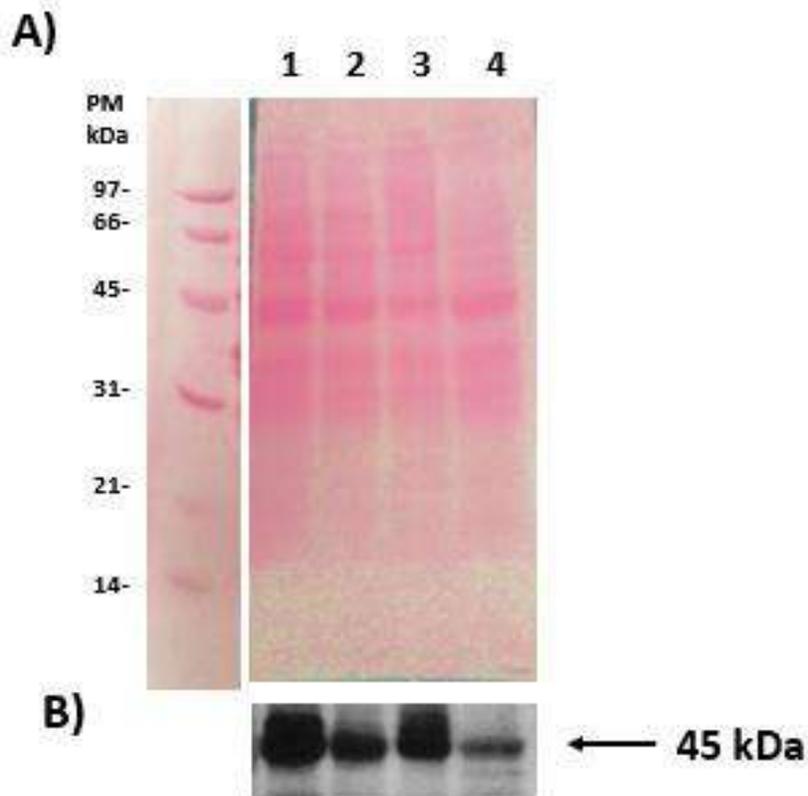


Figura 23. Inmunodetección de la subunidad $K_{ir}6.2$ en fracción mitocondrial. A) perfil de proteínas en membrana PVDF, B) Placa de la inmunodetección. Se cargaron 45 μ g de proteína, se separaron por electroforesis por espacio de 1 h aproximadamente en geles de poliacrilamida al 15 %, la inmunodetección se realizó empleando el anticuerpo comercial anti- $K_{ir}6.2$ (SC-20808, Santa cruz) a una dilución de 1:2000, la interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia. 1) grupo control, 2) grupo diabético, 3) grupo diabético+insulina, 4) grupo diabético+nicorandil.

8.2.2 Subunidad Kir6.1

Con el objetivo de evaluar si el desarrollo de diabetes afectaba los niveles de la subunidad Kir6.1 en los canales K_{ATP} del músculo esquelético, procedimos a realizar ensayos de Western blot tanto de los homogenados totales como de la fracción mitocondrial. De igual modo, se evaluó si las alteraciones producidas por la DM eran contrarrestadas por los tratamientos con insulina y con nicorandil. En la Figura 24 se muestran los homogenados totales del músculo esquelético de los diferentes grupos. En el panel A) se observa la membrana de PVDF teñida con rojo de Ponceau para mostrar el perfil de las proteínas transferidas, en la cual puede apreciarse una carga uniforme de las muestras. En el panel B) se muestra la placa de la inmunodetección empleando el anticuerpo específico para Kir6.1, en la cual observa la presencia de una banda del peso esperado de 45 kDa, correspondiente a la subunidad Kir6.1. Se puede apreciar que la intensidad de dicha banda no es homogénea en cada uno de los diferentes carriles, lo cual nos indica cambios en los niveles de dicha subunidad y se aprecia que el grupo diabético presentó una disminución de dicha subunidad en comparación del grupo control. Interesantemente en el grupo diabético tratado insulina no se observó señal alguna. En cambio, el grupo diabético tratado con nicorandil mostró un incremento en comparación con el grupo diabético incluso también mayor que el grupo control. Por otra parte, la Figura 25 se muestran las fracciones mitocondriales. En el panel A) se observa el perfil de las proteínas transferidas a membranas PVDF teñidas con rojo de Ponceau, en la cual puede apreciarse no hay diferencia en la carga de cada una de las muestras. En el panel B) se muestra

la placa de la inmunodetección empleando el anticuerpo específico para Kir6.1, en la cual observa la presencia de una banda de aproximadamente 45 kDa, corresponde al peso esperado para Kir6.1. Se observan diferencias en cuanto a los niveles de dicha subunidad debido a los diferentes tratamientos, se aprecia que el grupo diabético y el grupo diabético tratado con nicorandil presentaron una disminución siendo más evidente en este último, respecto al grupo control. En cambio, el grupo diabético tratado con insulina mostró una recuperación en los niveles en comparación del grupo diabético, inclusive también mayor que el grupo control.

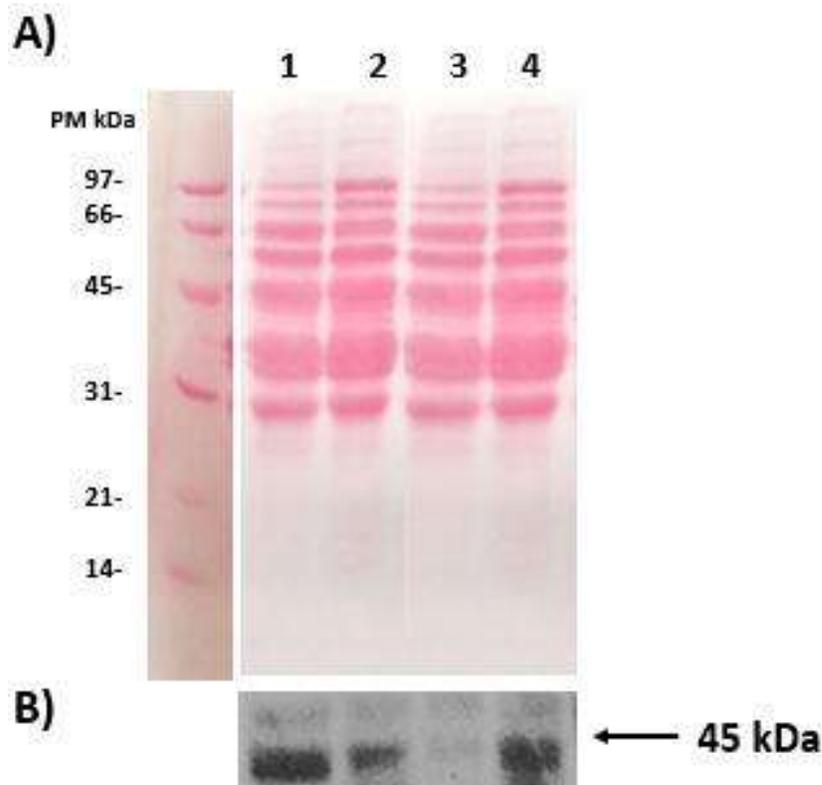


Figura 24. Inmunodetección de la subunidad Kir6.1 en homogenados totales. A) perfil de proteínas en membrana PVDF, B) Placa de la inmunodetección. Se cargaron 45 µg de proteína, se separaron por electroforesis por espacio de 1 h aproximadamente en geles de poliacrilamida al 15 %, la inmunodetección se realizó empleando el anticuerpo comercial anti-Kir6.1 (SC-20809) a una dilución de 1:2000, la interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia. La banda observada corresponde a la subunidad Kir6.1. 1) grupo control, 2) grupo diabético, 3) grupo diabético+insulina, 4) grupo diabético+nicorandil

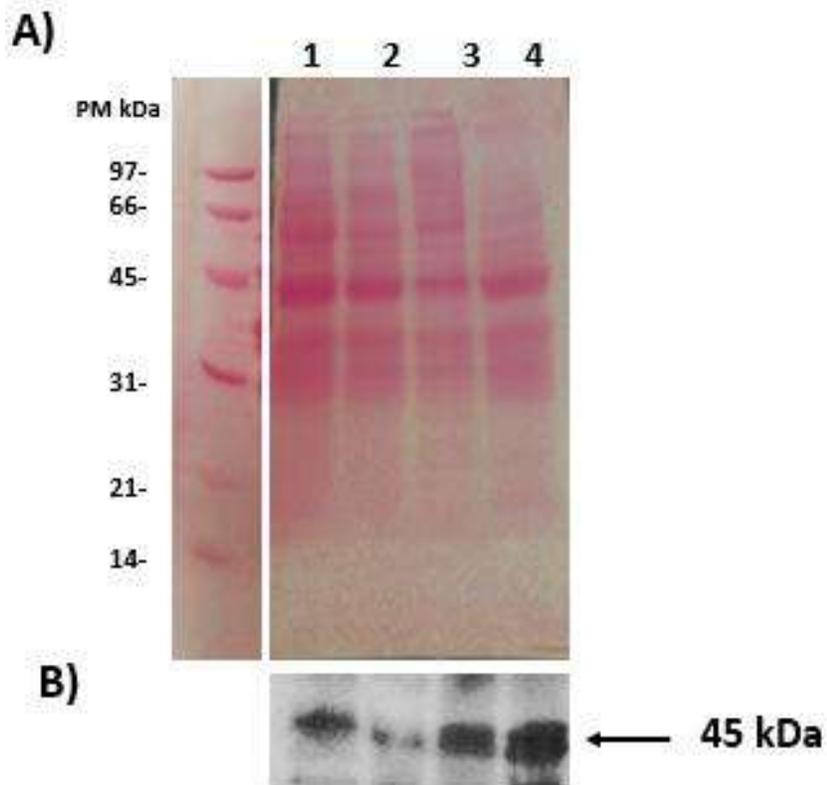


Figura 25. Inmunodetección de la subunidad Kir6.1 en fracción mitocondrial. A) perfil de proteínas en membrana PVDF, B) Placa de la inmunodetección. Se cargaron 45 μ g de proteína, se separaron por electroforesis por espacio de 1 h aproximadamente en geles de poliacrilamida al 15 %, la inmunodetección se realizó empleando el anticuerpo comercial anti-Kir6.1 (SC-20809, Santa Cruz) a una dilución de 1:2000, la interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia. La banda observada corresponde a la subunidad Kir6.1. 1) grupo control, 2) grupo diabético, 3) grupo diabético+insulina, 4) grupo diabético+nicorandil.

IX. DISCUSIÓN

En la actualidad el número de personas con enfermedades crónicas degenerativas va en aumento debido al tipo de vida sedentario que poseemos, la mala alimentación y la predisposición genética. Entre ese tipo de enfermedades destaca la diabetes mellitus (DM). La DM se caracteriza por el desarrollo de hiperglucemia crónica, provocada por una deficiencia en la producción de insulina, la acción de la insulina o la combinación de ambos factores, lo cual afecta principalmente el metabolismo de los carbohidratos, pero también de proteínas, las grasas e incluso de la proliferación celular (Bonora *et al.*, 2001). Es claro que, al existir una alteración en las vías de señalización implicadas en el metabolismo de las macromoléculas mencionadas anteriormente, habrá también por tanto alteraciones en la producción de ATP, lo cual conllevará a un menor rendimiento de la función muscular. Uno de los síntomas que son constantemente referidos por los pacientes es la fatiga, la cual puede tener varias connotaciones, sin embargo, la fatiga en una descripción simple, se concibe como la falta en la mantención de la producción de energía. Es claro que al no contar con la energía suficiente el sistema músculo-esquelético se verá disminuido en sus posibilidades de movimiento (Fritschi y Quinn, 2010).

Los cambios en la función muscular se deben a una combinación de factores: alteraciones en las α -motoneuronas, en las placas neuromusculares y en las mismas fibras musculares (Ramji *et al.*, 2007). La pérdida de la fuerza se ha

ligado a una excesiva infiltración de grasa lo que ocasiona disturbios en la organización fascicular (Hilton *et al.*, 2008) y la pérdida de las fibras tipo II y su denervación selectiva (Gutiérrez *et al.*, 2001). Existen reportes de que las mitocondrias del músculo esquelético diabético muestran una reducción en la capacidad de oxidación (Kelley *et al.*, 2002), sin embargo, también se le atribuido a este proceso el sedentarismo que es característico de las personas con diabetes y/o obesidad (Toledo *et al.*, 2008). Adicionalmente, existen varios reportes sobre los efectos que tiene la diabetes sobre la fisiología del músculo, reflejándose como atrofia, debilidad y una incrementada susceptibilidad a la fatiga (Andersen, 2012). Es precisamente la pérdida de masa muscular uno de los síntomas asociados al desarrollo de la DM, nuestros datos indican que los animales diabéticos mostraron un menor peso corporal en comparación del grupo control, sin embargo, es difícil establecer si esta pérdida únicamente ocurrió en masa muscular. En el caso del grupo diabético tratado con insulina, éste mostro una recuperación en cuanto al peso corporal en comparación con el grupo diabético, dicho incremento puede ser debido a la normalización de los niveles de glucosa en sangre debido a su metabolización en el interior de las células y con ello una normalización de otras vías metabólicas (de lípidos y proteínas principalmente), una reducción del estrés oxidativo asociado a la hiperglucemia crónica, así como también puede ser debido a alguna de los otros efectos producidos por la insulina como la síntesis de DNA, la replicación celular y sobre todo la estimulación y modulación de la transcripción y translocación de proteínas implicadas en el crecimiento celular (Lesniewski *et al.*, 2003). Interesantemente, el grupo diabético tratado con nicorandil también mostró una recuperación del peso corporal, incluso mayor que el grupo diabético tratado

con insulina, dichos resultados están apoyados por el trabajo de Kasono y colaboradores (2004) los cuales también observaron un incremento en el peso corporal en un modelo animal de DM1 cuando se les suministro nicorandil por un periodo de 30 días. Aunque no se puede hablar de un mecanismo a nivel molecular de por qué el nicorandil favorece el incremento de la masa muscular, existen reportes como es el caso de Fujirawa y colaboradores (1993) y de Paula y colaboradores (2013), donde se ha observado que el nicorandil puede tener o no efectos sobre la proliferación celular, y los autores sostienen que esta variedad de efectos puede deberse a los diferentes modelos de estudio utilizados (tipo de línea celular, organismo completo, etc.). Por lo cual presenta un campo interesante de estudio a abordarse.

Como mencionamos previamente, uno de los síntomas referidos por los pacientes diabéticos es la fatiga. Se ha documentado que los canales de potasio sensible a ATP (K_{ATP}) tanto de la membrana sarcolemal como de la membrana mitocondrial juegan un papel importante en la protección del músculo durante la fatiga. Es por ello que procedimos a realizar una serie de experimentos que nos permitieran dilucidar si la fatiga asociada a la DM está relacionada con una afectación en la función de estos canales. Lo primero que procedimos a realizar fue evaluar si existían diferencias en cuanto al tiempo necesario para que se estableciera la fatiga muscular en cada uno de los grupos mediante la aplicación de los protocolos de estimulación en los registros de tensión (Figura 14). Dichos resultados comprueban nuestra hipótesis de trabajo, es decir, que el grupo diabético fuera más susceptible a la aparición de la fatiga muscular. El efecto de la

apertura del $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ por acción del diazóxido (agonista específico del $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) reduce la fatiga durante la actividad muscular, confiere un mayor tiempo de resistencia a la aparición de la fatiga muscular y mayor desarrollo de fuerza cuando las fibras musculares se pre-incubaron con dicho fármaco, sin embargo, fue en un modelo de músculo esquelético sano (García *et al.*, 2009). Adicionalmente a lo reportado por ellos, observamos que el tratamiento de la diabetes con una administración prolongada del nicorandil y por lo tanto la apertura del $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, confirió un mayor grado de resistencia a la aparición de la fatiga muscular incluso mayor que la mostrada en un músculo no diabético.

Previamente en nuestro grupo de trabajo Andrade y colaboradores (2011) reportaron que al inhibirse los canales $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$ con glibenclamida, en el músculo esquelético lento fatigado, un incremento de la fuerza, es decir, el músculo se recupera de la fatiga. En nuestros experimentos, tal como se observa en la figura 15 se muestran los resultados obtenidos para el grupo control, se observó una recuperación de la tensión post-fatiga en presencia de la glibenclamida. La recuperación observada es debido a que la glibenclamida inhibe los canales $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$. Esta inhibición evita el acortamiento de la duración del potencial de acción, al activarse canales de Na^+ que causan la liberación de Ca^{2+} del RS (Matar *et al.*, 2000). Los iones de calcio interactúan con la troponina C permitiendo la formación de puentes cruzados que generan la contracción muscular. La glibenclamida al parecer, incrementa la liberación de Ca^{2+} del RS y a su vez el incremento en la sensibilidad al Ca^{2+} por los miofilamentos, lo que se refleja en un incremento de la tensión post-fatiga (Andrade *et al.* 2011).

Un cambio de la función contráctil de los músculos esqueléticos conduce a un aumento en la susceptibilidad a la fatiga en los pacientes diabéticos, lo que afecta desfavorablemente su estado y capacidad de trabajo. Por lo tanto, el desarrollo de enfoques para la recuperación de las funciones de la musculatura esquelética en los pacientes diabéticos es una de las tareas para su tratamiento y rehabilitación. Se ha vinculado un mal funcionamiento del sistema contráctil de los músculos esqueléticos con el desarrollo de la DM. En lo que respecta a nuestros resultados, evaluamos el efecto de la diabetes sobre la recuperación de la tensión post-fatiga en el músculo esquelético, para lo cual se probaron los mismos fármacos (glibenclamida y pinacidil) utilizados en los ensayos anteriormente ahora en el grupo diabético, esto con el fin de lograr para la apertura o bloqueo de los canales K_{ATP} . Tal como se aprecia en las figuras 17 y 18, respectivamente, no se observó recuperación de la tensión post-fatiga, como sí se observó en el grupo control, dicha afectación pudiera estar relacionada con una alteración en el funcionamiento de los canales K_{ATP} del músculo esquelético debido al desarrollo de la DM. A pesar del gran número de investigaciones acerca de la morfología, bioquímica y características contráctiles de los músculos esqueléticos, el número de estudios de la función muscular al inicio de la DM experimental es escasa, por lo cual aún no podemos establecer cuáles son las causas por las que la DM se encuentra afectando la función contráctil debido a alteraciones en el funcionamiento de los canales K_{ATP} . Sin embargo, otros reportes apoyan nuestros resultados sobre la afectación de la función contráctil debido a la DM, que abarcan desde lo que se refiere al desarrollo de fuerza tanto en el músculo lento como en el músculo rápido tal como lo reportan Stephenson y colaboradores (1994),

quienes observaron un menor grado de sensibilidad de las proteínas contráctiles por iones implicados en su funcionamiento en los músculos diabéticos comparados con los músculos control. Por su parte, Pelit y colaboradores (2008) encontraron un incremento en la tensión de reposo así como un menor desarrollo de fuerza de los músculos diabéticos en comparación de los no diabéticos independientemente de la frecuencia de estimulación. Huang y colaboradores (2014) observaron que a partir de la semana 4 los músculos diabéticos mostraban una reducción en cuanto a la fuerza de sacudida respecto a los músculos control, y que dicho efecto fue más evidente a la semana 16 ya que los músculos diabéticos desarrollaban menor fuerza que la mostrada en la semana 4. La mayoría de las investigaciones coinciden por lo tanto en una disminución constante de las respuestas contráctiles musculares en las condiciones de DM.

La principal función de la insulina es contrarrestar la acción de varias hormonas generadoras de hiperglucemia y de ese modo mantener bajos los niveles de glucosa en sangre. Además de su papel en la regulación del metabolismo de la glucosa, la insulina estimula la lipogénesis, disminuye la lipólisis, y aumenta el transporte de aminoácidos en las células (Clausen *et al.*, 2003), es evidente por tanto que esta hormona afecta un gran espectro de procesos metabólicos, cambia de estado funcional de los músculos esqueléticos, incluyendo por su puesto la función contráctil (Brotto *et al.* 2010). Es por ello que un déficit de insulina en la diabetes tipo 1 y la insensibilidad del tejido muscular a ella en la diabetes tipo 2 provocará alteraciones significativas en la actividad de los músculos esqueléticos. Bajo esta lógica, era de esperarse que el déficit de

insulina, el desarrollo de hiperglucemia y las consecuentes alteraciones sobre el sistema contráctil de los músculos fueran contrarrestados al suministrar insulina exógena, tal y como se puede apreciar en la Figura 19, en la cual se observa la recuperación de la tensión post-fatiga en el grupo diabético que le fue suministrada la insulina. Kubasov y colaboradores (2013) proponen que el déficit de insulina en DM está acompañado por la atenuación de la cascada de señalización de la insulina, que conduce a una disminución de la actividad de los canales de calcio dependiente de la insulina y proteínas de unión a calcio, que en conjunto producen alteraciones de la función contráctil de las células musculares. A este respecto, se puede sugerir que la eliminación de este déficit debido al tratamiento con insulina puede restaurar la actividad nuevamente las cascadas de señalización de insulina y mejorar las funciones de contracción de los músculos esqueléticos. Sin embargo, no se puede descartar que las afectaciones sobre la contracción muscular, también sean debido a alteraciones en el funcionamiento de los canales $\text{sarcoK}_{\text{ATP}}$, ya que estos también tienen la capacidad de controlar procesos durante el acople-excitación que derivan en la entrada de calcio a la fibra muscular y la consecuente contracción muscular (Matar *et al.*, 2000). Además, las perturbaciones observadas durante la DM sobre la función contráctil pueden estar asociadas con una atenuación de la actividad de las vías de señalización activadas por la insulina, así como con la acción dañina del estrés oxidativo en las células musculares cuyas causas bajo estas condiciones de hiperglucemia son agudos o de largo plazo. Por lo tanto, el suministro exógeno de insulina favoreció a contrarrestar los efectos negativos de la DM previamente mencionados sobre los músculos.

La apertura del $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ permite la recuperación de la tensión post-fatiga, tal como lo observaron García y colaboradores (2009), así como en nuestro grupo de trabajo (Andrade *et al.*, 2011; Sánchez-Duarte *et al.*, 2012). El nicorandil es considerado a nivel mitocondrial un activador específico de los canales $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ en células cardiacas (Sato *et al.*, 2000) y en el músculo esquelético (Cahoon *et al.*, 2013) ya que induce un incremento en la tensión post-fatiga. Además, el nicorandil protege del estrés oxidativo debido a que inhibe la producción de ERO's ocasionado por la alta concentración de la glucosa (Serizawa *et al.*, 2012). En lo que respecta a nuestro trabajo, se exploró el efecto de un tratamiento prolongado de nicorandil (5 mg/kg-2 sem) con la finalidad de determinar la posible participación del canal $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ en la recuperación de la tensión post-fatiga en el músculo esquelético lento de ratas diabéticas. La recuperación observada de la tensión post-fatiga en presencia de la glibenclamida y el pinacidil (Figuras 21 y 22 respectivamente) en el músculo diabético puede ser atribuido al tratamiento con nicorandil. Recientemente se ha demostrado en el músculo esquelético de cerdo, que el nicorandil tiene un efecto protector ante la isquemia muscular (Cahoon *et al.*, 2013); de igual forma, durante la fatiga también se involucra un proceso isquémico, por lo cual el nicorandil en nuestros resultados, también mostró un efecto protector ante la fatiga, al incrementar la tensión post-fatiga en el músculo diabético. Sánchez-Duarte y colaboradores (2012) demostraron que el efecto de recuperación de la tensión post-fatiga en un músculo esquelético no diabético por parte de nicorandil, fue antagonizado por 5-HD (un bloqueador específico del $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$), al no observar cambios en la recuperación de la tensión después de

haber sido fatigado el músculo. Por lo tanto, esta serie resultados sugieren que el efecto protector es mediado por el tratamiento de la diabetes con la administración prolongada del nicorandil ante la fatiga, posiblemente sea a través de la apertura del $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$.

Nuestros datos respecto a la presencia del canal K_{ATP} en el músculo esquelético son apoyados por los resultados reportados por Banas y colaboradores (2011), quienes describen la presencia de la subunidad $\text{K}_{\text{ir}6.2}$ en fracciones de diversos músculos de ratones (sóleo, flexor y extensor digitorio) trabajo que les permitió observar si existían diferencias respecto a la abundancia de los K_{ATP} según el tipo del músculo y del tipo de fibra muscular, concluyendo que, sí existen diferencias en la expresión, ya que encontraron una menor expresión de la subunidad $\text{K}_{\text{ir}6.2}$ en las fibras oxidativas del músculo sóleo, mientras que la mayor abundancia fue en las fibras glucolíticas del músculo flexor. Por otro lado, Nielsen *et al.* (2003), respecto a la localización del canal K_{ATP} en el músculo esquelético de humano utilizando diversas técnicas como fraccionamiento de membrana, gradientes de sacarosa, Western blot, encontrando que los canales K_{ATP} se encuentran principalmente en el sarcolema. La presencia de $\text{K}_{\text{ir}6.1}$ como una subunidad constituyente del canal $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ se refuerza debido a los reportes de Zhou *et al.* (2005), que sugieren que la subunidad $\text{K}_{\text{ir}6.1}$ es la subunidad del canal K_{ATP} mitocondrial. Con anticuerpos específicos encontraron que las mitocondrias contienen ambos tipos de subunidades (tanto $\text{K}_{\text{ir}6.1}$ como $\text{K}_{\text{ir}6.2}$), aunque consideran que la subunidad $\text{K}_{\text{ir}6.1}$ está principalmente localizado en la mitocondria. Sin embargo, no se sabe con precisión si estos canales se co-

expresan con las subunidades SUR2A o SUR2B. Otros trabajos sugieren la heteromultimerización de las subunidades Kir6.1 y Kir6.2 dentro del complejo en el mismo canal pero de manera separada, es decir, algunos están constituidos por la subunidad Kir6.1 y otros por la subunidad Kir6.2 (Kono *et al.*, 2000; Pountney *et al.*, 2001). Nuestros resultados mostrados en las Figuras 24-27, coinciden por lo tanto con los reportes arriba mencionados por lo tanto refuerzan los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto a los cambios en los niveles proteicos de los canales K_{ATP} debido a la DM, así como a los diferentes tratamientos implementados. Esta serie de resultados respecto a una disminución de los niveles de las subunidades de los canales K_{ATP} del músculo esquelético debido al desarrollo de la DM y una posterior restauración de dichas subunidades debido a la normalización de los niveles de glucosa debido a la administración de insulina, son respaldados por los datos obtenidos por Zhih y colaboradores (2012) al trabajar con canales $_{sarco}K_{ATP}$ cardiacos ya que son similares a los nuestros. Lo anterior puede ser indicativo de que la administración exógena de insulina activó nuevamente vías de señalización afectadas por el desarrollo de la DM, pues recordemos que la insulina estimula y modula la transcripción, translocación de proteínas, el crecimiento celular, la síntesis de DNA, y la replicación celular y por lo tanto no se puede descartar que proteínas implicadas en el ensamble y constitución de los canales K_{ATP} sean blancos de estas vías dependientes de insulina. Finalmente, creemos que la restauración de los niveles de la subunidad Kir6.1 en mitocondria es debido al tratamiento de la diabetes con el nicorandil, sin embargo, en ambos casos es necesario realizar más estudios para corroborar dicho efecto y en un futuro dilucidar es mecanismo por lo que esto acontece.

X. CONCLUSIÓN

El desarrollo de la DM altera el funcionamiento y la expresión de los canales K_{ATP} del músculo esquelético y por lo tanto la función contráctil, dichas alteraciones pueden ser revertidas debido al tratamiento con insulina, así como por el nicorandil.

XI. REFERENCIAS

Aguilar-Bryan L., Nichols C.G., Wechsler S.W., Clement J.P., Boyd A.E. (1995). Cloning of the cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**: 423–26.

Aguilar-Bryan L., Clement J.P., Gonzalez G., Kunjilwar K., Babenko A., Bryan J. (1998). Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol. Rev.* **78**: 227–245.

Ashcroft F.M., Gribble F.M. (1998). Correlating structure and function in ATP-sensitive K^+ channels. *Trends Neurosciences* **21**: 288–294.

Ashcroft F., Kakei M. (1989a). ATP-sensitive K^+ channels in rat pancreatic β -cells: modulation by ATP and Mg^{2+} ions. *J. Physiol.* **416**: 349–367.

Ashcroft F., Rorsman P. (1989b). Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **54**: 87–143.

Ashford M.L.J., Sturgess, N.C., Trout N.J., Gardner N.J. y Hales C.N. (1988). Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurons. *Pflugers. Arch.* **412**: 297-304.

Ashford M.L.J., Boden P.R., Treherne J.M. (1990). Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K^+ channels. *Pflügers. Arch.* **415**: 479–483.

Allen D.G., Lamb G.D., Westerblad H. (2008). Skeletal muscle fatigue: mechanisms. *Physiol. Rev.* **88**: 287-332.

Andrade M.F., Trujillo X., Sánchez E., Montoya R., Saavedra A., Ortiz M., Huerta M. (2011). Glibenclamide increases post-fatigue tensión in slow skeletal muscle fibers of the chicken. *J. Comp. Physiol. B.* **181**: 403-412

Ballanyi K. (2004). Protective role of neuronal K_{ATP} channels in brain hypoxia. *J. Exp. Biol.* **207**: 3201–3212.

Banas K., Clow C., Jasmin B.J., Renaud J.M. (2011). The K_{ATP} channel Kir6.2 subunit content is higher in glycolytic than oxidative skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **301**: 916–925.

Barre H., Berne G., Brebion P., Cohen-Adad F., Rouanet J.L. (1989). Loose-coupled mitochondria in chronic glucagon-treated hyperthermic ducklings. *Am. J. Physiol.* **256**: 1192-1199.

Barrett J.R. y McPherson A.G. (1998). Characterization of K_{ATP} channels in intact mammalian skeletal muscle fibres. *Br. J. Pharmacol.* **123**: 1103–1110.

Beguin P., Nagashima K., Nishimura M., Gonoï T., Seino S. (1999). PKA-mediated phosphorylation of the human K_{ATP} channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J.* **18**: 4722–4732.

Bottinelli, R. (2001). Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibres: do myosin isoforms tell the whole story? *Pflugers. Arch.* **443**: 6-17.

Cook D. L. y Hales C. N. (1984). Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic β -cells. *Nature* **311**: 271-273.

Chutkow W.A, Simon M.C, Le Beau M.M, Burant C.F. (1996). Cloning tissue expression and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle and vascular K_{ATP} channels. *Diabetes* **45**:1439–45.

Davies N.W., McKillen H.C., Stanfield P.R., Standen N.B. (1996). A rate theory model for Mg²⁺ block of ATP-dependent potassium channels of rat skeletal muscle. *J. Physiol.* **490**:817-826.

D'hahan N., Moreau C., Prost A., Jacquet H., Alekseev A., Terzic A., Vivaudou M. (1999) Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12162–12167.

Duty S., Allen D.G. (1995). The effects of glibenclamide on tetanic force and intracellular calcium in normal and fatigued mouse skeletal muscle. *Exp. Physiol.* **80**: 529–541.

Eckert R., Randall D., Augustine G. (1989) Músculo y movimiento. Fisiología Animal, Mecanismos y adaptaciones. 3ª edición. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México. Capítulo 10:329-367.

Fernández M. (1996). Biología molecular de la diabetes mellitus. *Rev. Endoc. Nutr.* **4**: 55-62.

Friedman A. (1999). Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diab Care.* **22 suppl 2**: B65-B71.

Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V., Sun X., Schindler P.A. (1996). The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J. Biol. Chem.* **271**: 8796–8799

Gopel S., Kanno T., Barg S., Rorsman P. (2000a). Patch-clamp characterization of somatostatin-secreting cells in intact mouse pancreatic islets. *J. Physiol.* **528**: 497–507.

Gopel S., Kanno T., Barg S., Weng X., Gromada J., Rorsman P. (2000b). Regulation of glucagon release in mouse cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na_v channels. *J. Physiol.* **528**: 509–520.

Gornal A.G., Bardavill C.J., David M.M. (1984). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**: 751-760.

Gong B., Miki T., Seino S., Renaud J.M. (2000). A K_{ATP} channel deficiency affects resting tension, not contractile force, during fatigue in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **279**: 1351–1358.

Gramolini A., Renaud J.M. (1997). Blocking ATP-sensitive K⁺ channel during metabolic inhibition impairs muscle contractility. *Am. J. Physiol.* **272**: 1936–1946.

Gross G. J., Fryer M.R. (1999). Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ. Res.* **84**: 973-979.

Grover G.J., Garlid K.D. (2000) ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**: 677-95.

Gumina R., Pucar D., Bast P., Hodgson D., Kurtz C., Dzeja P., Miki T., Seino S., Terzic A. (2003). Knockout of Kir6.2 negates ischemic preconditioning-induced protection of myocardial energetics. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **284**: 2106–2113.

Gutman G.A., Chandy K.G., Adelman J.P., Aiyar J., Bayliss D.A., Clapham D.E., Covarriubias M., Desir G.V., Furuichi K., Ganetzky B., Garcia M.L., Grissmer S., Jan L.Y., Karschin A., Kim D., Kuperschmidt S., Kurachi Y., Lazdunski M., Lesage F., Lester H.A., McKinnon D., Nichols C.G., O'Kelly I., Robbins J., Robertson G.A., Rudy B., Sanguinetti M., Seino S., Stuehmer W., Tamkun M.M., Vandenberg C.A., Wei A., Wulff H., Wymore R.S. (2003). Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **55**: 583-586.

Halestrap A.P. (1989). The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **973**: 355-382.

Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* **90**: 291–366.

Hill W.R., Gordon A.W. (2004). *Fisiología Animal*. Madrid, España. Editorial Medica panamericana.

Huerta M., y Stefani E. (1981). Potassium and caffeine contractures in fast and slow muscles of the chicken. *J. Physiol.* **318**:181-9.

Inagaki N., Gono T., Clement J.P.T., Namba N., Inazawa J., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L., Seino S., Bryan J. (1995b) Reconstitution of K_{ATP}: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**: 1166–1170.

Inagaki N., Gono T., Clement J.P.T., Wang C.Z., Aguilar-Bryan L., (1996.) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP sensitive K⁺ channels. *Neuron*. **16**: 1011–1017.

Inagaki, N., Seino, S. (1998) ATP-sensitive potassium channels: structures, functions, and pathophysiology. *Jpn. J. Physiol.* **48**: 397-412.

Inagaki N., Tsuura Y., Namba N., Masuda K., Gono T. (1995b). Cloning and functional characterization of a novel ATP sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J. Biol. Chem.* **270**: 5691–5694.

Inoue I., Nagase H., Kishi K. y Higuti T. (1991). ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**: 244-247.

Isomoto S., Kondo C., Yamada M., Matsumoto S., Higashiguchi O., (1996). A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP sensitive K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **271**: 24321–24324.

Jiang C., Sigworth F., Haddad G. (1994). Oxygen deprivation activates an ATP-inhibitable K⁺ channel in substantia nigra neurons. *J. Neurosci.* **14**: 5590–5602.

Jöns T., Wittschieber D., Beyer A., Meier C., Brune A., Thomzig A., Ahnert-Hilger G., Veh W. R. (2006). K⁺-ATP-channel-related protein complexes: potential transducers in the regulation of epithelial tight junction permeability. *J. Cell Sci.* **119**: 3087-3097.

Kane G.C., Behfar A., Yamada S., Perez-Terzic C., O'Coirlain F., Reyes S., Dzeja P.P., Miki T., Seino S., Terzic A. (2004) ATP-sensitive K⁺ channel knockout compromises the metabolic benefit of exercise training, resulting in cardiac deficits. *Diabetes* **53**: 169–175.

Kono Y., Horie M., Takano M., Otani H., Xie L.H., Akao M., Tsuji K., Sasayama S. (2000). The properties of the KIR6.1-6.2 tandem channel co-expressed with SUR2A. *Pflugers Arch.* **440**: 692–698.

Kowaltowski A. J., Seetharaman S., Paucek P., Garlid K. D. (2001). Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: 649-657.

Kubo Y., Adelman J.P., Clapham D.E., Jan L.Y., Karschin A., Kurachi Y., Lazdunski M., Nichols C.G., Seino S., Vandenberg C.A. (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**: 509-526.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lewis S.F. y Haller R.G. (1986). The pathophysiology of McArdle´s disease: clues to regulation in exercise and fatigue. *J. Physiol.* **61**: 391-401.

Light P.E., Comtois A.S., Renaud J.M. (1994). The effect of glibenclamide on frog skeletal muscle: evidence for K_{ATP} channel activation during fatigue. *J. Physiol.* **475**: 495–507.

Lin D., Sterling H., Lerea K.M., Giebisch G., Wang W.H. (2002). Protein kinase C (PKC)-induced phosphorylation of ROMK1 is essential for the surface expression of ROMK1 channels. *J. Biol. Chem.* **277**: 44278–44284.

Lopez G. (2009). Diabetes Mellitus: clasificación, fisiopatología y diagnóstico. *Medwave.* **9**: 315-321

López CH. J., Fernández V.A. (2006) Fisiología del ejercicio. 3ra edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial medica panamericana.

Matar W., Nosek T. M., Wong D., y Renaud J. M. (2000). Pinacidil suppresses contractility and preserves energy but glibenclamide has not effect during muscle fatigue. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**:404-416.

Martínez M. J., Lastra I, Luzuriaga C. (2002). Perfil psicosocial de niños y adolescentes con diabetes mellitus. *Bol. Pediatr.* **42**:114-119.

Metzger J.M., Moss R.L. (1987). Greater Hydrogen ion-induced depression of tension and velocity in skinned skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **393**: 727-742.

Miki T., Minami K., Zhang L., Morita M., Gono T., Shiuchi T., Minokoshi Y. Renaud J.M., Seino S. (2002). ATP-sensitive potassium channels participate in glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283**: 1178–1184.

Miki T., Nagashima K., Tashiro F., Kotake K., Yoshitomi H., Tamamoto A., Gono T., Iwanaga T., Miyazaki J., Seino S. (1998). Defective insulin secretion and enhanced insulin action in K_{ATP} channel-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10402–10406.

Montoya-Pérez R., Saavedra-Molina A., Trujillo X., Huerta M., Andrade F., Sánchez-Pastor E., Ortiz M. (2010). Inhibition of oxygen consumption in skeletal muscle-derived mitochondria by pinacidil, diazoxide, and glibenclamide, but not by 5-hydroxydecanoate. *J. Bioenerg. Biomembr.* **42**: 21-27.

Morrissey A., Rosner E., Lanning J., Parachuru L., Chowdhury D.P., Han S., Lopez G., Tong Y.X., Yoshida H., Nakamura Y.T., Artman M., Giblin P.J., Tinker A., Coetzee A.W. (2005). Immunolocalization of K_{ATP} channel subunits in mouse and rat cardiac myocytes and the coronary vasculature. *BMC Physiology*. **5**: 12-15.

Murphy K., Greenfield S. (1991). ATP-sensitive potassium channels counteract anoxia in neurones of the substantia nigra. *Exp. Brain. Res.* **84**: 355–358.

Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**:1124-1136.

Nielsen J. J., Michael K., Ylva H., Jens B., and Carsten J. (2003). Localization and function of ATP-sensitive potassium channels in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **284**: 558–563.

Noma A. (1983). ATP-regulated K₁ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**:147–148.

Page S.G. (1969). Structure and some contractile properties of fast and slow muscles of the chicken. *J. Physiol.* **205**:131–145.

Palacios R.L., Pagés C.I., Blasco M.J., González A.V. (2005) Fisiología Animal. Barcelona, España. Editorial Publicacions I Edicions de la universitat de Barcelona. ISBN 84-475-3010-8.

Pancorbo S.A.E. (2012). Medicina y ciencias del deporte y la actividad física. España. Editorial Oceano/Ergon. Vol.1. ISBN 978-84-15142-14-0

Pang, X.D. Guinan J.J. Jr. (1997). Effects of stapedius-muscle contractions on the masking of auditory-nerve responses. *J. Acoust. Soc. Am.* **102**:3576-86.

Paucek P., Mironova G., Mahdi F., Beavis A.D., Woldegiorgis G., Garlid, K.D. (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **267**:26062-26069.

Pountney D.J., Sun Z.Q., Porter L.M., Nitabach M.N., Nakamura T.Y., Holmes D., Rosner E., Kaneko M., Manaris T., Holmes T.C., Coetzee W.A. (2001). Is the molecular composition of K_{ATP} channels more complex than originally thought? *J.Mol. Cell. Cardiol.* **33**: 1541–1546

Pulido N., Casla A., Suarez A., Casanova B., Arrieta F.J., Rovira A. (1996). Sulphonylurea stimulates glucose uptake in rats through an ATP-sensitive K⁺ channel dependent mechanism. *Diabetologia* **39**: 22–27.

Quast U. (1996). ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **354**: 213–225.

Quayle J., Nelson M., Standen N. (1997). ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.* **77**: 1165–1232.

Quinn K.V., Giblin J.P., Tinker A. (2004) Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP sensitive K⁺ channel. *Circ. Res.* **94**: 1359–1366.

Robergs R.A., Ghiasvand F., Parker D. (2004) Biochemistry of exercise induced metabolic acidosis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**: 502–516.

Routh V. (2002). Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol. Behav.* **76**: 403–413.

Saavedra M A., Delvin T. M. (1997). Effect of extra- and intramitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids.* **12**: 293-298.

Sakura H., Ämmälä C., Smith P.A., Gribble F.M., Ashcroft F.M. (1995). Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* **377**: 338–344.

Sato T., O’rourke B., Marban E. (1998). Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. *Circ. Res.* **83**: 110–114.

Shi Y., Wu Z., Cui N., Shi W., Yang Y., Zhang X., Rojas A., Ha B.T., Jiang C. (2007). PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular KATP channel activation by β -adrenergic receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**: 1205–1214.

Shimizu S., Saito M., Kinoshita Y., Ohmasa F., Dimitriadis F., Shomori K., Hayashi A., Satoh K. (2011). Nicorandil ameliorates ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Br. J. Pharmacol.* **163**: 272–282.

Sims N.R. (1990). Rapid isolation of metabolically active mitochondrial from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J. Neurochem.* **55**: 698-707.

Skalska J., Debska G., Kunz W.S., Szewczyk A. (2005). Antidiabetic sulphonylureas activate mitochondrial permeability transition in rat skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* **145**: 785-791.

Seghers V., Nakazaki M., DeMayo F., Aguilar-Bryan L., Bryan J. (2000). Sur1 knockout mice, a model for K_{ATP} channel-independent regulation of insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **275**: 9270–9277.

Seharaseyon J., Ohler A., Sasaki N., Fraser H., Sato T., Johns D.C., O'Rourke, Marban E. (2000). Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels probed by viral Kir gene transfer. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**:1923-1930.

Seino S. (1999). ATP-Sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu. Rev. Phys* **61**: 337-362.

Seino S., Miki T. (2003). Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81**: 133–176.

Schmid-Antomarchi H., De Weille J., Fosset M., Lazdunski M. (1987). The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 15840–15844.

Silverthorn D. U. (2009) Fisiología humana: un enfoque integrado. Buenos Aires, Argentina, Editorial Medica Panamericana.

Spruce A.E., Standen N.B., Stanfield P.R. (1987). Studies of the unitary properties of adenosine-5-triphosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle. *J. Physiol.* **382**: 213–236.

Spruce A.E., Standen N.B., Stanfield P.R. (1985). Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* **316**:736–38.

Standen N.B., Quayle J.M., Davies N.W., Brayden J.E., Huang Y. (1989). Hyperpolarizing vasodilators activate ATP sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* **245**:177–80.

Suzuki M., Fujikura K., Inagaki N., Seino S., Takata K. (1997). Localization of the ATP-sensitive K⁺ channel subunit Kir6.2 in mouse pancreas. *Diabetes* **46**:1440–44.

Suzuki M., Kotake K., Fujikura K., Inagaki N., Suzuki T., Gono T., Seino S., Takata K. (1997) Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**: 693-697.

Suzuki M., Sasaki N., Miki T., Sakamoto N., Ohmoto-Sekine Y., Tamagawa M., Seino S., Marban E., Nakaya H. (2002). Role of sarcolemmal KATP channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Clin. Invest.* **109**: 509–516.

Taylor I., Cama A., Accili D., Barbetti F., Imano E., Kadowaki H. (1991). Genetic basis of endocrine disease 1 molecular genetics of insulin resistant diabetes mellitus. *J. Clin. Endocr. Metab.* **73**:1158-1163.

Thakar J.H., Hassan M.N. (1988). Effects of 1-methyl -phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), cyperquat (MPP+) and paraquat on islates mitochondria from rat striatum cortex and liver. *Life Sci.* **43**: 143-149.

Thebet M., Miki T., Seino S., Renaud J.M. (2005). Treadmill running causes significant damage in skeletal of muscle KATP channel deficient mice. *Physiol. Genomics* **22**: 204–212.

The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diab. Care.* **20**: 1183-1197.

Thompson L.V., Balog E.M., Fitts R.H. (1992). Muscle fatigue in frog semitendinosus: role of intracelular pH. *Am. J. Physiol.* **262**: 1507-1512.

Tobwin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 4350-4354.

Tricarico D., Mele A., Lundquist A.L., Desai R.R., George A.L. Jr, Conte Camerino D. (2006). Hybrid assemblies of ATP-sensitive K⁺ channels determine their muscle-type-dependent biophysical and pharmacological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:1118-1123.

Tricarico D., Mele A., Camerino G.M., Bottinelli R., Brocca L., Frigeri A., Svelto M., George A.L. Jr, Camerino D.C. (2010). The K_{ATP} channel is a molecular sensor of atrophy in skeletal muscle. *J. Physiol.* **588**:773-84.

Tusnády G.E, Bakos E., Varadi A., Sarkadi B. (1997). Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett.* **402**:1-3.

Wagman A. (2001) Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes. *Curr. Pharm. Des.* **7**: 417-450.

Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N. (1982). Distantly related sequences in the α and β subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**:945–951

Westerblad H., Allen D.G., Lännergren J. (2002). Muscle fatigue: lactic acid or inorganic phosphate the major cause? *News Physiol. Sci.* **17**: 17–21.

Wintrob N., Sprecher E., Shosshana I. (2001). Type 1 diabetes environmental factors and correspondence analysis of HLA class II genes in the yemenite jewish community in Israel. *Diab. Care.* **24**: 650-653.

Whitehead P., Clark F., Urso B., James E. (2000). Signalling through the insulin receptor. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 222-228.

Woll K.H., Lönnendonker U., Neumcke B. (1989). ATP-sensitive potassium channels in adult mouse skeletal muscle: different modes of blockage by internal cations, ATP and tolbutamide. *Pflügers. Arch.* **414**:622–628.

Yamada M., Isomoto S., Matsumoto S., Kondo C., Shindo T., Horio Y., Kurachi Y. (1997). Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J. Physiol.* **499**: 715–720.

Yamada K., Ji J., Yuan H., Miki T., Sato S., Horimoto N., Shimizu T., Seino S., Inagaki N. (2001). Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science* **292**: 1543–1546.

Yamada K., Inagaki N. (2005). Neuroprotection by K_{ATP} channels. *J. Mol. Cell Cardiol.* **38**: 945–949.

Zingman L.V., Hodgson D.M., Bast P.H., Kane G.C., Perez-Terzic C., Gumina R.J., Pucar D., Bienengraeber M., Dzeja P.P., Miki T., Seino S., Alekseev A.E., Terzic A.

(2002). Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 13278–13283.

Zhou M., Tanaka O., Sekiguchi M., He H.J., Yasuoka Y., Itoh H., Kawahara K., Abe H. (2005). ATP-sensitive K⁺-channel subunits on the mitochondria and endoplasmic reticulum of rat cardiomyocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **53**:1491-1500.