

POTENCIACION POST-ACTIVIDAD TARDIA EN MUSCULO ESQUELETICO DE LA RATA

Juan García Ramos*

El músculo es una máquina en la cual la energía química se convierte en calor y energía mecánica; a diferencia de las hechas por el hombre, puede adaptarse a varias situaciones sea incrementando su eficiencia después de activación repetida acompañada de hipertrofia, o reducir su eficiencia que resulta en atrofia por falta de uso.⁵ Esto sucede aun cuando el músculo esté desconectado del sistema nervioso. El mecanismo de estos cambios adaptativos propios de las fibras musculares ha sido poco estudiado. La manera de realizar este acoplamiento químico-mecánico varía y su regulación mediante grados diferentes de actividad todavía no se conoce. El problema estaría en saber cuál o cuáles de las reacciones químicas pudieran estar asociadas con la síntesis de proteínas contráctiles y cuándo sucede este proceso después de una contracción. Podemos especular que la hipertrofia del músculo como resultado tardío de actividad repetida puede ser consecuencia de un mecanismo químico reversible activado en dirección positiva por las contracciones repetidas. La falta de actividad podría dar el cambio opuesto.²

En el presente trabajo no se intenta tratar con las reacciones químicas implicadas en la hipertrofia del músculo. Una excelente revisión del metabolismo y la energía del músculo esquelético puede encontrarse en el artículo de Homsher y Kean (1978). Muchas de las adaptaciones bioquímicas después del ejercicio son también conocidas. Ver por ejemplo la revisión de Holloszy (1973).

Nuestro propósito fue sólo estudiar algu-

nas de las circunstancias en que ocurre mejoría temprana de la actividad mecánica muscular. Se trató de mostrar la posibilidad de que la hipertrofia muscular pudiera ser resultado de la suma de muchos procesos que ocurren durante o después de breves y repetidos periodos de actividad.

Con objeto de reducir los numerosos factores de error, se seleccionó para este estudio uno de los músculos esqueléticos de la rata, el complejo gastrocnemio-sóleo que es uno de los más accesibles. El metabolismo de esta especie es razonablemente constante de uno a otro animal de la misma cepa y de la misma edad, sexo y programa nutricional.

METODO

Los experimentos se realizaron en 50 ratas albinas machos (Wistar) con peso entre 170-220 g. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg por kg intraperitonealmente, agregándose la mitad de esa dosis cada 45 minutos). Se usaron los músculos gastrocnemius y soleus. Ambos tendones de Aquiles fueron desprendidos junto con un pedazo de hueso y fueron amarrados por medio de un cordón de nylon a transductores de tensión (modelo *Grass FT 10*) conectados a amplificadores c.c. de un polígrafo modelo *Grass 7*. La tensión inicial del músculo fue alrededor de 100 g.

Cada una de las epífisis inferiores de los fémures fueron perforadas con agujas gruesas fijadas a barras verticales firmemente unidas a la mesa. La rata yacía sobre su dorso con los fémures flexionados sobre la pelvis; así el músculo gastrocnemio se contraía en posición horizontal y las patas quedaban suspendidas pa-

* Departamento de Fisiología. Centro Universitario de Investigación en Ciencia y Tecnología. Universidad de Colima. Apartado Postal 199. 28000 Colima, Col. México.

ra reducir la fricción del músculo. La tráquea fue abierta pero no se introdujo cánula, excepto para los experimentos con droga curarizante (bromuro de pancuronio, 3 mg/kg intraperitonealmente). En experimentos con músculo denervado previamente, el nervio ciático se cortó a la mitad del muslo 5 días antes. Se tomaron electromiogramas por medio de dos finas agujas insertadas arriba del tendón de Aquiles paralelas a las fibras musculares, dichos electromiogramas se registraron en un osciloscopio *Tektronix 502 A*. Se usaron electrodos similares para medir los cambios de impedancia muscular. Se hicieron mediciones con un medidor de impedancias *General Radio Company, Type 1650-A* a frecuencia de 1 kHz aproximadamente.

Los experimentos con agentes bloqueadores de la síntesis proteínica: cicloheximida o cloramfenicol, se llevaron a cabo en animales cuya temperatura corporal se controló con precisión ya que estos medicamentos pueden producir disminución de la temperatura. Las sustancias fueron disueltas en solución salina tibia e inyectadas intraperitonealmente 10 a 15 minutos antes de la segunda o tercera estimulación subtetánica, a la dosis de 10-20 mg por kg. Se ha visto que estas dosis reducen significativamente la velocidad de la síntesis proteínica durante un corto periodo (Barondes, 1970).

Para los experimentos con drogas curarizantes se estableció respiración artificial a una frecuencia similar a la respiración normal; el volumen de aire fue sólo suficiente para deprimir los movimientos respiratorios. Cuando había pasado la decurarización y después de la supresión de la respiración artificial, los animales empezaron a respirar normalmente. En todos estos casos uno de los gastrocnemio se estimuló repetidamente a través de su nervio a baja velocidad con objeto de controlar el curso temporal y la profundidad de la acción del bromuro de pancuronio.

Las medidas de impedancia se hicieron para controlar cambios posibles de la circulación de la sangre que pudieran participar en la aparición de la potenciación tardía. Los registros mostraron, como lo describió Dubuisson (1937) en músculos aislados, aumento en la impedancia

en tiempo similar pero retrasándose en relación al cambio de tensión, y un componente de declinación gradual que en estas observaciones duró cerca de 20 segundos. El valor de los cambios de impedancia fue de 2 ó 3 ohms para los electrodos utilizados colocados cerca de 2 mm uno del otro. Para los propósitos de este trabajo, los valores basales de la impedancia fueron los que se siguieron. Se insertaron electrodos estimuladores en el extremo periférico del nervio ciático machacado en la parte alta del muslo, o por dos agujas insertadas en el vientre del músculo también denervado severamente. Se obtuvieron pulsos cuadrados de dos estimuladores *Grass S4* con una fuerza 20% arriba de la máxima, usualmente de 0.05 mseg y 2 volts para el nervio, y de 5 mseg y 100 volts para el músculo, y se aplicaron a velocidad de 0.1 por seg o más lento, denominándose estímulo de prueba. Los periodos de condicionamiento de actividad relativamente alta (HA) variaron de 1 a 20 Hz; fueron choques con la misma fuerza aplicada anteriormente por periodos de 5 a 60 seg.

La temperatura del animal fue seguida con un termómetro rectal y mantenida constante por medio de una lámpara colocada arriba de la rata (variaciones de la temperatura seleccionada entre 37 a 38 grados centígrados resultaron usualmente menores de dos décimas de grado, a menos que se estudiara el efecto de la temperatura).

RESULTADO

Las preparaciones fueron primero probadas aplicándoles una serie de estímulos de prueba durante 20 a 30 minutos para asegurarse de que respondía de modo constante y reproducible. Después de este periodo de control se aplicó un tren corto de estímulos condicionadores y seguido por una potenciación prolongada y tardía de las respuestas a subsecuentes estímulos de prueba. El pico de esta potenciación apareció de 20 a 30 minutos después de la estimulación HA condicionadora (Fig 1). No siempre un primer periodo HA dio potenciación tardía (puntos en las figuras 2A y 2B a la izquierda del 0 de la línea del tiempo). Sin embargo, un segundo periodo HA de esti-

mulación aplicado después de un intervalo de segundos o minutos del primero, produjo clara potenciación tardía. Este efecto sumado, también se observó después de periodos breves repetidos de estimulación HA con intervalos más largos que se previó fueran aplicados cuando la potenciación previa no había cesado completamente. La potenciación incluyó: aumento en la amplitud a los choques de prueba de cerca de 10 a 20 por ciento arriba del nivel de control (Figs. 1, 3, 4, y 5); durante un tétanos incompleto la tensión se elevó a mayor velocidad sobre una tensión basal aumentada (Figs. 3 y 4).

Estos cambios tardíos no aparecieron cuando se dejó descender la temperatura del animal abajo de 35 grados centígrados y reapareció después de varias horas del recalentamiento. La asfixia de la rata por oclusión parcial de la tráquea, produjo una potenciación similar a la descrita pero apareció muy tempranamente y revirtió con facilidad cuando la respiración del animal se recuperó. La asfixia de los músculos solos también indujo este último tipo de potenciación pero fue necesario ocluir casi completamente la arteria iliaca; solamente duró el periodo de oclusión de la arteria y no fue muy prolongado. La asfixia de larga duración produjo el cambio opuesto, o sea, depresión de las respuestas.

En experimentos repetidos, un tétanos de alta frecuencia, particularmente si se mantie-

ne durante un tiempo relativamente grande, produce depresión por fatiga después de la bien conocida potenciación post-tetánica. Esta depresión enmascaró la fase de potenciación tardía o retrasada ya descrita. Por otro lado, un grado de actividad baja del músculo, tal como reducir su fuerza o la frecuencia del estímulo de prueba, también causó depresión de la actividad cuando se reanudaron la intensidad adecuada y la velocidad de los choques de la prueba (Fig. 5). En los experimentos aquí mencionados, las respuestas a choques de prueba únicos pueden mostrar amplitud disminuida después de varias horas si no se interpusieron algunos periodos de actividad relativamente alta. Esta depresión también puede deberse a deterioro gradual de la preparación, lo que es poco común. Por todas estas razones las estimulaciones tetánicas de baja frecuencia se aplicaron solamente por periodos breves y se tuvo gran cuidado de mantener a los animales bajo las mejores condiciones posibles. En un músculo crónicamente denervado la potenciación post-actividad tardía estuvo también presente, aunque bajo estas condiciones fue necesario reducir la velocidad de la estimulación HA y aplicar los choques de prueba a velocidad reducida (menos de 0.1 por seg) ya que la fatiga interfiere con la potenciación. Bajo el efecto del curare, la potenciación tardía ocurrió en la magnitud y curso temporal usuales (Fig. 5).

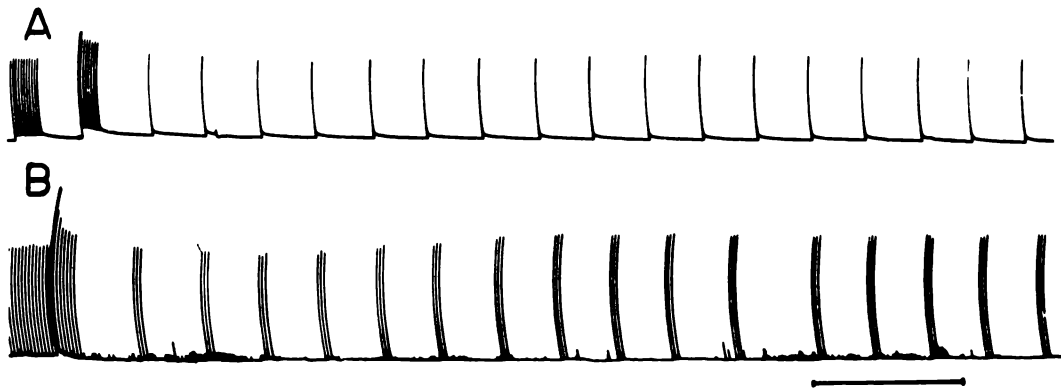


Fig. 1. Ejemplos representativos de la potenciación tardía y su curso temporal después de un breve periodo de actividad alta (HA) a 20 por seg durante 2 seg (flechas) en **A**, y a 10 por seg por 5 seg en **B**. Estimulación a alta frecuencia así como estímulos de prueba, fueron de fuerza supramáxima y aplicados indirectamente (registro **A**) o directamente (registro **B**). No se evaluó la amplitud ya que la tensión desarrollada en las respuestas testigo se tomó como referencia (100 por ciento).

Tiempo 5 minutos.

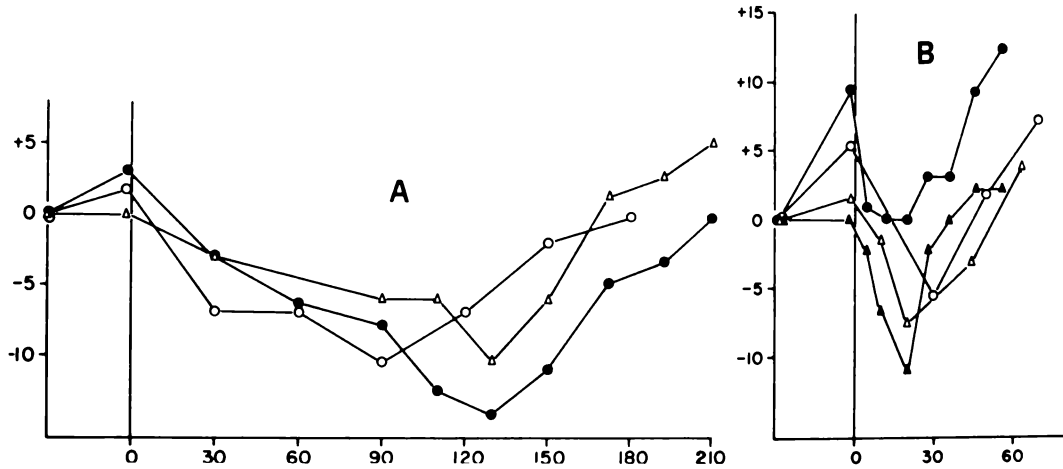


Fig. 2. (A) Efecto de la cicloheximida (20 mg. por kg) aplicada intraperitonealmente en tiempo cero. Los símbolos diferentes son de animales diferentes. El primer valor indica la amplitud control de la respuesta mecánica a los estímulos de prueba. Este valor se tomó como 100 por ciento (variación porcentual cero). Los segundos valores son respuestas registradas 25 minutos después de la primera estimulación HA. El medicamento se inyectó 10 minutos antes del segundo periodo breve de estimulación HA a la misma velocidad y duración de la primera (10 por seg por 10 seg). Los siguientes valores corresponden a amplitud de las respuestas de prueba inmediatamente antes de la aplicación de nuevos e iguales periodos de HA. Ordenadas: incrementos porcentuales o decrementos en amplitud. Abscisas: tiempo en minutos. (B) Igual que en A, pero en otra serie de experimentos en la cual fueron inducidos trenes breves de HA a intervalos más cortos. Nótese la suma de efectos de periodos repetidos de HA que interfieren con la depresión inducida por la cicloheximida.

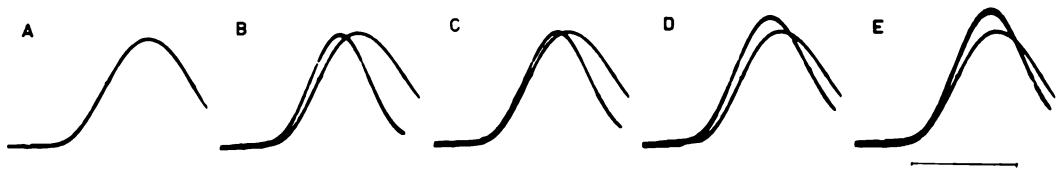


Fig. 3. Respuestas mecánicas que muestran cambios en la amplitud, velocidad de elevación y duración después de 30 minutos de cada uno de los periodos de HA a 10 por seg durante 10 seg aplicados a intervalos de 30 minutos. El EMG registrado simultáneamente no mostró cambio correspondiente. A, control previo. B, C, D, y E, después de 30 minutos de dicho periodo de HA; en estos mecanogramas el trazo de la respuesta control aparece sobrepuesta. Tiempo: 50 mseg.

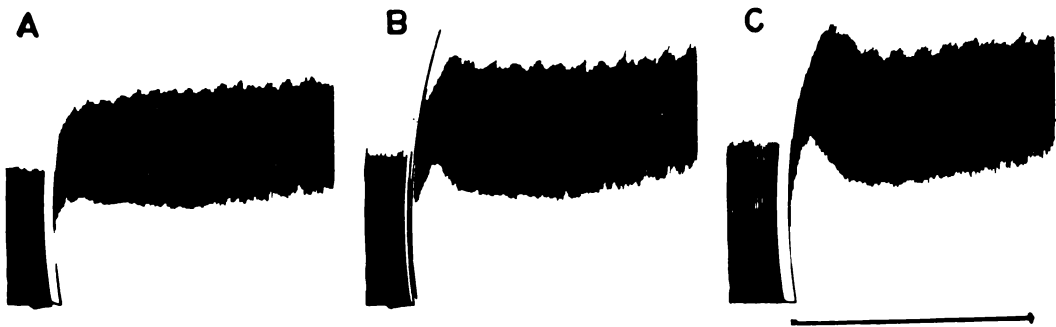


Fig. 4. Cambios de las respuestas mecánicas durante la potenciación postactividad tardía revelados por la mejor suma de la tensión del músculo durante un tétanos incompleto (20/seg. durante 15 seg). A, control. B, 50 minutos después de A. C, 60 minutos después de B. La longitud del tiempo es 10 minutos para el periodo anterior a la estimulación tétánica y 10 seg durante este periodo.

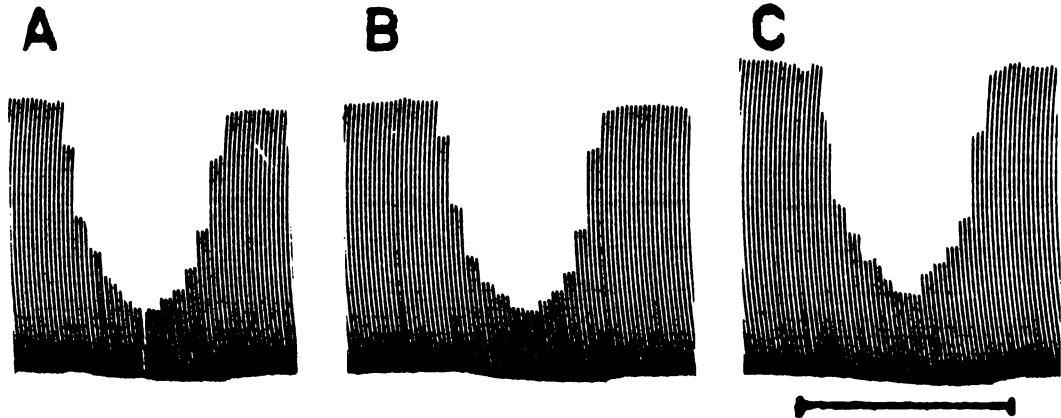


Fig. 5. Potenciación postactividad tardía en un músculo curarizado. Animal bajo respiración artificial. **A**, control antes de un periodo de HA (1 por seg durante 60 seg). **B**, 30 minutos después de esta actividad relativamente alta. Después de que se tomaron estos registros, se repitió dos veces la misma estimulación de alta frecuencia con un intervalo de 5 minutos. **C**, fue registrado después de 30 minutos del último periodo de HA. La decurarización se siguió en los músculos del lado opuesto y empezó 40 minutos después del final de **C**. Los escalones en la amplitud de los mecanogramas se deben a la reducción de la duración de los estímulos (de 7 a 1 msec) y luego aumenta en dirección opuesta en escalones de 1 msec. Este tipo de prueba se hizo con la idea de tratar de encontrar el tipo de fibras musculares más afectadas por la potenciación, ya que las fibras lentas son activadas para choques de duración más larga. No se encontró diferencia cuando se ajustaron las respuestas más altas hasta el 100%. Nótese que los escalones en ascenso son un poco más bajos en amplitud que las respuestas correspondientes de los escalones en descenso para estímulos de la misma fuerza, lo que puede deberse a la pequeña reducción de la actividad durante la prueba. Tiempo: 10 minutos.

Los electromiogramas de periodos de potenciación tardía no mostraron aumento en la amplitud o duración en comparación con los testigos. El valor basal de la impedancia en el reposo al principio del experimento y con el músculo no estirado fue de 70 ohms y 200 nF. Después de estirar el músculo a la tensión inicial basal utilizada, la resistencia disminuyó y la capacitancia aumentó, primero en forma rápida y luego lentamente. Después de 10 a 20 minutos los nuevos valores alcanzaron nivel estable. En el curso de las observaciones arriba y abajo de este valor estable, hubo variaciones lentas que probablemente representaban cambios vasomotores "espontáneos". Después de un periodo de estimulación HA hubo una caída rápida de la impedancia seguida por una recuperación lenta. Esta caída fue interpretada como debida al aumento del aporte sanguíneo que se sabe ocurre en el músculo después de un periodo de actividad. Estas variaciones de impedancia eléctrica recayeron principalmente en el componente de resistencia. Fuera de estos cambios no se registraron otros que pudieran ser correlacionados con la aparición de la po-

tenciación mecánica tardía o retrasada que se hubiera registrado.

DISCUSION

No es sorprendente que a continuación de un periodo de hiperactividad muscular haya mejoría en las respuestas mecánicas. Se sabe que esto sucede después del entrenamiento muscular. Estos resultados tratan de hacer incapié en que aun un periodo de actividad corto puede inducir potenciación mecánica significativa. Han sido descritos algunos cambios bioquímicos después del entrenamiento tanto en la rata como en el hombre (Holloszy y Booth, 1976; Henriksson, 1977; Dons *et al*, 1979; Dudley *et al*, 1982). Es posible que aun un periodo corto de actividad pueda inducir alguna adaptación bioquímica, la cual por sumación con otros pequeños cambios del mismo tipo pudieran finalmente resultar en aparente mejoría tardía de la actividad de músculos entrenados.

Los presentes resultados indican que el o los mecanismos de la potenciación retrasada o tardía descritos residen principalmente en el

músculo mismo y no en las fibras nerviosas o en la unión neuro muscular. Por un lado, los electromiogramas no mostraron cambios paralelos; por otro, el fenómeno fue observado en músculos curarizados. Los efectos menores obtenidos en músculos denervados pueden explicarse por cambios bioquímicos importantes producidos por la denervación, lo que conduce a la aparición rápida de fatiga.

Una posibilidad alternativa es que la potenciación retrasada pudiera ser consecuencia de un cambio en la circulación local del músculo. Los resultados de la asfixia local o general inducida sugieren que la reducción del flujo sanguíneo podría ser el cambio que ocurre. Esta posibilidad parece ser excluida por las observaciones de que no hay cambios correlacionados con la impedancia del músculo; sin embargo, la reducción del flujo sanguíneo no puede venir sólo por un cambio funcional en los vasos del músculo. En otras palabras, no sería una reducción real en el flujo sanguíneo del músculo sino una simple acumulación de metabolitos no compensada por flujo sanguíneo adecuado, interpretación que podría estar apoyada por la sumación observada de los efectos en periodos sucesivos de estimulación a actividad alta. Sin embargo, si éste fuera el caso, permanecería inexplicada la falta de potenciación tardía en el músculo de una rata enfriada a 35°C en la cual la eficiencia del trabajo muscular no está significativamente alterada y se podría presumir que en este caso las reacciones bioquímicas, fuente de energía, no son grandemente afectadas.

Otra posible interpretación de la potenciación tardía es que los estímulos podrían activar fibras nerviosas catecolaminérgicas que van al músculo. Se sabe que esto puede suceder para la estimulación fuerte directa, y si ésta fuera la explicación, la potenciación sería mayor para la estimulación directa que la que se observa con la indirecta. En este último caso los estímulos fueron usualmente de 0.05 mseg de duración y 2 V de intensidad que pueden apenas estimular las fibras nerviosas simpáticas. De hecho, la potenciación fue mayor en los músculos bajo estimulación indirecta. Por otro lado, la liberación de catecolamina podría no explicar fácilmente el efecto aditivo de trenes su-

cesivos de estimulación HA aplicada a intervalos relativamente largos (30 a 60 minutos).

La interpretación preferida para la potenciación tardía es que cambios bioquímicos importantes aplicados como consecuencia del periodo de condicionamiento de HA, conducen a un aumento en la síntesis proteínica.^{7,10,11,12} Los efectos bloqueadores de la cicloheximida o el cloramfenicol apoyan esta última sugerencia. Parece que la síntesis proteínica está en estado dinámico. Booth (1982) mencionó que la síntesis proteínica caía en 35% después de la inmovilización de un músculo durante 6 horas.*

RESUMEN

Después de un breve periodo de actividad a relativamente alta frecuencia de los músculos gastrocnemio-sóleo en la rata anestesiada con pentobarbital, se registró una potenciación retrasada que duró más de 60 minutos. Esta potenciación se observó tanto con estimulación indirecta como directa aplicada a los músculos curarizados o denervados. Dicha potenciación fue anulada transitoriamente por agentes bloqueadores de la síntesis proteínica (cicloheximida y cloramfenicol). Durante este periodo de potenciación, ninguno de los electromiogramas ni los cambios de impedancia del músculo entero mostraron alguna variación correlacionada. Varios periodos breves de estimulación a frecuencia relativamente alta, a intervalos de 1 a 60 minutos mostraron efectos aditivos. Por el contrario, la falta de estimulación mostró reducción de respuestas a choques de prueba. Estas observaciones sugieren que la actividad del músculo causa ciertos cambios bioquímicos tardíos y pasajeros que sumados pueden constituir la base de la hipertrofia del músculo. La reversión de estas reacciones bioquímicas en el reposo pueden ser la base de la depresión de la acción mecánica del músculo y de su atrofia por falta de uso.

*Agradecimiento a Miguel Paredes por su asistencia técnica.

SUMMARY

After a brief period of relatively high frequency activity of the gastrocnemius-soleus muscles in pentobarbital anesthetized rat, a delayed potentiation lasting for more than 60 min was recorded. This potentiation was observed either with indirect or with direct stimulation applied to the denervated or curarized muscle. This potentiation was transiently blocked by the protein-synthesis blocking agents (cycloheximide and chloramphenicol). During this stage of potentiation neither the electromyograms nor the impedance changes of the whole muscle showed any correlated variation. Several brief periods of relatively high frequency stimulation, at intervals from to 60 min showed additive effects. On the contrary the lack of that stimulation resulted in reduction of the responses to test shocks. These observations suggest that activity of a muscle causes certain late biochemical changes, of transient duration, which summated may constitute the basis for muscle hypertrophy. The reversion of these biochemical reactions at rest could be the basis of the depression of muscle mechanical performance and the atrophy by disuse.

BIBLIOGRAFIA

1. **Barondes, S.H.:** "Is the amnesic effect of cycloheximide due to specific interference with a process in memory storage?" in *Protein Metabolism of the Nervous System*. A. Lajtha (Editor) Plenum Press. New York, London, 1970.
2. **Booth, F.W.:** "Effect of limb immobilization on skeletal muscle." *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* **53:** 1113-1118, 1982.
3. **Dons, B., K. Bollerup, F. Bonde-Peterson and S. Hancke.:** "The effect of weight-lifting exercise related to muscle fibre composition and muscle cross-sectional area in humans". *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **40:** 95-106, 1979.
4. **Dubuisson, M.:** "Impedance changes in muscle during contraction and their possible relation to chemical processes." *J. Physiol. (Lond.)* **89:** 132-152, 1937.
5. **Ernst, E.:** (1967) in *Symposia Biologica Hungarica*. Vol. 8. E. Ernst and F.B. Straub (Eds.) Akadémiai Kiadó, Budapest, 1968.
6. **Dudley, G.A., W.M. Abraham and R.L. Terjung.:** "Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle." *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* **53:** 844-850, 1982.
7. **Homsher, E. and Ch. J. Kean.:** "Skeletal muscle energetics and metabolism," *Ann. Rev. Physiol.* **40:** 93-131, 1978.
8. **Henriksson, J.:** "Training induced adaptation of skeletal muscle and metabolism during submaximal exercise." *J. Physiol. (Lond.)* **270:** 661-675, 1977.
9. **Holloszy, J.O.:** "Biochemical adaptations to exercise: Aerobic metabolism." *Exercise Sports Sci. Rev.* **1:** 46-71, 1973.
10. **Holloszy, J.O. and F.W. Booth.:** "Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle." *Ann. Rev. Physiol.* **38:** 273-291, 1976.
11. **Jablecki, C.K., J.E. Heuser and S. Kaufman.:** "Autoradiographic localization of new RNA synthesis in hypertrophying skeletal muscle." *J. Cell. Biol.* **57:** 743-759, 1973.
12. **Omsted, P.T. and A. von der Decken.:** "Dietary amino acids: affect of depletion and recovery on protein synthesis *in vitro* in rat skeletal muscle and liver." *Br. J. Nutr.* **31:** 67-76, 1974.
13. **Turto, H., S. Lindy and J. Halme.:** "Protocollagen proline hydroxylase activity in work- induced hypertrophy of rat muscle." *Amer. J. Physiol.* **27:** 33-38, 1974.
14. **Watt, P.W., F.J. Kelly, D.F. Goldspink and G. Goldspink.:** "Exercise induced morphological and biochemical changes in skeletal muscles of the rat." *J. Appl. Physiol. Respirat. Environ. Exercise Physiol.* **53:** 1144-1151, 1982.