

**CARACTERIZACIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN LA FUNCIÓN
CONTRÁCTIL EN SACUDIDA SIMPLE DURANTE ISQUEMIA Y
REPERFUSIÓN ENTRE MÚSCULOS OXIDATIVOS Y
GLICOLÍTICOS DE RATAS ADULTAS.**

CAMILO MORALES JIMENEZ

**Trabajo de investigación para optar el título de Magíster en Ciencias
Básicas Médicas**

**DIRECTOR
LEONARDO FIERRO PEREZ
Ph.D. FISILOGIA Y BIOFISICA**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS**

SANTIAGO DE CALI - 2010

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Cali, Marzo de 2010

*Dedicado al Dr. Luis María Borrero,
por su ejemplo como investigador científico
y su dedicación a la fisiología muscular.*

*A mi esposa y mi hija,
por todo el amor que me llena de tranquilidad
y fe para convertir mis sueños en realidad.*

*A mi familia,
Por el respaldo, motivación y amor que me dan
día a día.*

INDICE	Pág.
1. Introduccion	11
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo general	15
2.2. Objetivos especificos	15
3. Marco teorico	16
3.1. Músculo esquelético.	16
3.2. Excitabilidad del músculo esquelético.	16
3.3. Acoplamiento excitación – contracción muscular y liberación de Ca^{2+} .	19
3.4. Relajación de la contracción.	20
3.5. Entrada de Ca^{2+} .	22
3.6. Energética de la contracción muscular.	23
3.7. Fibras musculares tipo I y tipo II.	24
3.8. Síndrome isquemia-reperfusión del músculo esquelético.	25
3.9. Mecanismos de lesión muscular en los procesos de isquemia-reperfusión.	27
3.10. Respuesta funcional del músculo esquelético a la isquemia y a la isquemia-reperfusión.	28
3.11. Respuesta metabólica del músculo esquelético a la isquemia y a la isquemia-reperfusión.	31
3.12. Homeostasis de Ca^{2+} del músculo esquelético durante la isquemia-reperfusión.	37
4. Materiales y metodología.	38
4.1. Animales para experimentación.	38
4.2. Procedimientos generales.	39
4.3. Músculos para experimentación y su estimulación.	39
4.4. Mediciones de la función muscular.	40
4.5. Parámetros funcionales medidos y analizados en la sacudida simple.	42
4.6. Diseño experimental.	43
4.6.1. Caracterización de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo SOL y en el músculo ERLC durante 1, 2, y 3 horas de isquemia.	43
4.6.2. Caracterización de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo SOL y en el músculo ERLC durante 1, 2, y 3 horas de isquemia seguidas de 1 hora de perfusión.	44
4.6.3. Caracterización de las diferencias significativas que presentan los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple durante isquemia-reperfusión, entre el músculo SOL y el músculo ERLC.	45

5. Resultados.	46
5.1. Caracterización de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo SOL y en el músculo ERLC durante 1, 2, y 3 horas de isquemia.	46
5.1.1. Músculo soleo (sol).	46
5.1.2. Músculo extensor radial largo del carpo (ERLC).	55
5.2. Caracterización de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo SOL y en el músculo ERLC durante 1, 2, y 3 horas de isquemia seguidas de 1 hora de reperusión.	66
5.2.1. Músculo soleo (sol).	66
5.2.2. Músculo extensor radial largo del carpo (ERLC).	75
5.3. Caracterización de las diferencias significativas que presentan los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple durante isquemia y reperusión, entre el músculo SOL y el músculo ERLC.	85
5.3.1. Caracterización de las diferencias significativas de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple durante isquemia entre el músculo SOL y el músculo ERLC.	85
5.3.2. Caracterización de las diferencias significativas de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple durante isquemia-reperusión entre el músculo SOL y el músculo ERLC.	88
6. Discusion.	96
6.1. Modelo in-vivo del traumatismo isquemia-reperusión en el músculo esquelético.	96
6.2. Efectos metabólicos durante isquemia sobre el acoplamiento excitación-contracción.	99
6.3. Efectos metabólicos durante isquemia sobre la contracción muscular.	102
6.4. 1 hora de isquemia.	103
6.5. 2 horas de isquemia.	107
6.6. 3 horas de isquemia.	110
6.7. Reperusión.	111
7. Bibliografia.	113

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Histología del músculo soleo con hematoxilina eosina (x40).	28
Figura 2. Cambios observados a 1, 2 y 3 horas, en presencia de isquemia, en la tensión máxima en la sacudida simple normalizada por la tensión medida a tiempo 0.	29
Figura 3. Cambios en la tensión máxima en la sacudida simple normalizada por la tensión a tiempo 0.	30
Figura 4. Cambio en la tensión activa en sacudida simple.	31
Figura 5. Montaje experimental, vista frontal.	41
Figura 6. Montaje experimental, vista superior.	42
Figura 7. Contracción típica en sacudida simple del músculo soleo.	42
Figura 8. Derivada en función del tiempo de la contracción típica en sacudida simple del músculo soleo.	43
Figura 9. Contracción típica en sacudida simple del músculo soleo.	43
Figura 10. Grupos experimentales de caracterización de la sacudida simple durante la isquemia.	44
Figura 11. Grupos experimentales de caracterización de la sacudida simple durante la isquemia-reperusión.	44
Figura 12. Fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo.	47
Figura 13. Integral fuerza (sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo.	48
Figura 14. Tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo.	49
Figura 15. Tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo.	50
Figura 16. Tasa máxima de contracción ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo.	52
Figura 17 (arriba). Tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo.	53
Figura 18 (abajo). Tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo.	55
Figura 19. Fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia para el músculo para el músculo ERLC.	57
Figura 20. Integral fuerza (sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC.	58
Figura 21. Tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC.	59
Figura 22. Tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo músculo ERLC.	61
Figura 23. Tasa máxima de contracción ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC.	63
Figura 24. Tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC.	64
Figura 25. Tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC.	65
Figura 26. Fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia –reperusión para el músculo soleo.	67
Figura 27. Integral fuerza (sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) en función del tiempo de isquemia- reperusión para el músculo soleo.	69
Figura 28. Tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo Soleo.	70
Figura 29. Tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo soleo.	71

Figura 30. Tasa máxima de contracción ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo soleo.	72
Figura 31. Tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo soleo.	73
Figura 32. Tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo soleo.	74
Figura 33. Fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo para el músculo ERLC.	76
Figura 34. Integral fuerza _(sacudida-simple) -tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo ERLC.	78
Figura 35. Tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo ERLC.	79
Figura 36. Tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo músculo ERLC.	80
Figura 37. Tasa máxima de contracción ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo ERLC.	81
Figura 38. Tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo ERLC.	82
Figura 39. Tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) en función del tiempo de isquemia - reperusión para el músculo ERLC.	84
Figura 40. Comparación de la Fuerza máxima (ΔF_{CSmax}) y la Integral fuerza _(sacudida-simple) -tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) normalizadas a tiempo cero en función del tiempo de isquemia entre músculo soleo y ERLC.	85
Figura 41. Comparación de tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) normalizada a tiempo cero en función del tiempo de isquemia entre músculo soleo y ERLC.	86
Figura 42. Comparación del Tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) y Tasa máxima de contracción ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ normalizadas a tiempo cero en función del tiempo de isquemia entre músculo soleo y ERLC.	87
Figura 43. Comparación del tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) y tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) normalizadas a tiempo cero en función del tiempo de isquemia entre músculo soleo y ERLC.	88
Figura 44. Comparación de la fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) normalizada a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - reperusión entre músculo soleo y ERLC.	89
Figura 45. Comparación de la Integral fuerza _(sacudida-simple) -tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) normalizadas a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - reperusión entre músculo soleo y ERLC.	90
Figura 46. Comparación de tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) normalizad0 a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - reperusión entre músculo soleo y extensor radial largo del carpo.	91
Figura 47. Comparación del tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) normalizado a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - reperusión entre músculo soleo y ERLC.	92
Figura 48. Comparación de la tasa máxima de contracción ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ normalizada a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - reperusión entre músculo soleo y extensor radial largo del carpo.	93
Figura 49. Comparación de tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) normalizado a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - reperusión entre músculo soleo y extensor radial largo del carpo.	94
Figura 50. Comparación de la tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) normalizada a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - reperusión entre músculo soleo y extensor radial largo del carpo.	95
Figura 51. Resumen del efecto del Pi en los parámetros funcionales durante la primera hora de isquemia muscular.	106
Figura 52. Resumen del efecto de la disminución del pH en los parámetros funcionales durante la primera hora de isquemia muscular.	107

Figura 53. Resumen de los efectos acumulados de Pi y pH en los parámetros funcionales durante la segunda hora de isquemia muscular. Se muestran los puntos donde el pH podría alterar la función muscular.	109
Figura 54. Resumen de los efectos metabólicos acumulados en la concentración de Ca^{2+} intracelular durante la tercera hora de isquemia muscular.	110

RESUMEN

La isquemia se define como la falta parcial o total de aporte de sangre a un órgano o a parte de él, producida por una alteración normal o patológica de la arteria o arterias aferentes al órgano. La isquemia puede llevar a la disfunción o a la muerte celular por necrosis. De otro lado, la reperfusión ocurre cuando el flujo sanguíneo retorna a un tejido después de un periodo de isquemia. Aunque permite la recuperación del tejido, limitando la necrosis post-isquémica, se ha descrito que la reperfusión puede en si misma lesionar los tejidos, ocasionando la "lesión por reperfusión" y en ocasiones la "necrosis por reperfusión". Las lesiones del músculo esquelético secundarias al traumatismo mediado por isquemia-reperfusión se presentan en diversas situaciones clínicas tales como la enfermedad arterial periférica oclusiva, la oclusión vascular aguda seguida de revascularización durante procedimientos quirúrgicos y durante el trabajo muscular concéntrico de alta intensidad. Dos rasgos comunes a estas situaciones clínicas son el dolor muscular agudo y la pérdida temporal de la fuerza muscular. Esta pérdida funcional se estudia mediante el empleo de modelos experimentales con ratas. Utilizando estos modelos se ha observado que el daño funcional del músculo esquelético inducido por el traumatismo secundario a isquemia-reperfusión, se profundiza en la medida que aumenta el tiempo de la isquemia y depende en menor medida del tipo de fibras que componen el músculo.

La implementación de un modelo animal del traumatismo secundario a isquemia-reperfusión de músculo esquelético es de gran utilidad para evaluar e implementar terapias que puedan ser útiles para prevenir y minimizar las lesiones, el dolor y la limitación funcional, observadas durante situaciones clínicas que presenten lesiones del músculo esquelético secundarias al traumatismo mediado por isquemia-reperfusión. Pese a ello, la evaluación de la función contráctil simple no se ha hecho de forma completa para músculos oxidativos y glicolíticos. Considerando lo anterior, en este trabajo de investigación hemos adelantado un estudio de investigación basado en experimentación con animales. Utilizando este modelo in-vivo hemos caracterizado las diferencias significativas en la función contráctil simple durante isquemia y reperfusión, entre el músculo soleo (predominantemente oxidativo) y el músculo extensor radial largo del carpo (predominantemente glicolítico) de ratas adultas. Específicamente, hemos caracterizado los cambios en los parámetros de la contracción simple en ambos músculos durante 1, 2, y 3 horas de isquemia seguidas de 1 hora de reperfusión y a partir de estos datos, hemos analizado las diferencias significativas que presentan estos cambios entre los dos grupos musculares. Los resultados muestran cambios en parámetros como el tiempo de latencia y la tasa máxima de relajación que no han sido reportados previamente en la literatura. Al comparar el comportamiento entre los dos músculos se observan también diferencias en estos dos parámetros y en el tiempo medio de relajación, las cuales tampoco se han reportado.

Palabras clave: músculo esquelético, isquemia, reperfusión, función contráctil, músculos oxidativos, músculos glicolíticos, modelos animales.

1. INTRODUCCION

Las lesiones del músculo esquelético secundarias al traumatismo mediado por isquemia-reperfusión se presentan en diversas situaciones clínicas tales como: (1) la enfermedad arterial periférica oclusiva (Pipinos et al., 2007; Pipinos et al., 2008), la cual se considera que a nivel mundial puede afectar entre un 15 y un 20% de los sujetos mayores de 70 años (Martínez, 2009), (2) la oclusión vascular aguda seguida de revascularización durante la cirugía vascular electiva, durante la cirugía ortopédica que implica la utilización de un torniquete y durante los trasplantes que contienen tejido muscular esquelético (Schellong, Ockert, y Zimmermann, 1998; Khanna, Cowled & Fitridge, 2005), y (3) durante el trabajo muscular concéntrico de alta intensidad (Graven-Nielsen & Arendt-Nielsen, 2008). Dos rasgos comunes a estas situaciones clínicas son el dolor muscular agudo y la pérdida temporal de la fuerza muscular. (Carvalho & McKee, 1992; Schellong, Ockert & Zimmermann, 1998; Khanna, Cowled & Fitridge, 2005; Pipinos et al., 2007; Graven-Nielsen & Arendt-Nielsen, 2008; Pipinos et al., 2008).

La isquemia se define como la falta parcial o total de aporte de sangre a un órgano o a parte de él, producida por una alteración normal o patológica de la arteria o arterias aferentes al órgano. La isquemia puede llevar a la disfunción o a la muerte celular por necrosis (Blaisdell, 2002). Desde el punto de vista histológico, la isquemia puede no tener consecuencias, producir necrosis selectiva parenquimatosa o producir infarto y atrofia (Blaisdell, 2002). De otro lado, la reperfusión ocurre cuando el flujo sanguíneo retorna a un tejido después de un periodo de isquemia. Aunque permite la recuperación del tejido, limitando la necrosis post-isquémica, se ha descrito que la reperfusión puede en si misma lesionar los tejidos, ocasionando la “lesión por reperfusión” y en ocasiones la “necrosis por reperfusión” (observadas usualmente en el miocardio) (Ma, Qui & Chen, 2008). Los efectos de la lesión por reperfusión dependen, entre otros, de los daños causados por la isquemia y del grado de sensibilidad de cada tejido. Se conoce que el daño se debe en parte a la respuesta inflamatoria que se produce en los tejidos afectados por la isquemia-reperfusión (Ma, Qui & Chen, 2008).

Los efectos del traumatismo por isquemia-reperfusión sobre el músculo esquelético se han caracterizado en tres niveles; (1) celular, (2) metabólico y (3) funcional (Blaisdell, 2009). Las respuestas celulares y metabólicas son objeto de estudio actualmente (Rubin et al., 1996; Carvalho, McKee & Green, 1996; Korth et al., 2000; Blaisdell, 2002; Mense, 2009). Las respuestas funcionales se pueden estudiar mediante el empleo de modelos experimentales con ratas (Turchányi et al., 2005; Mense, 2009). Utilizando estos modelos se ha observado que el daño funcional del músculo esquelético inducido por el traumatismo secundario a isquemia-reperfusión, se profundiza en la medida que aumenta el tiempo de la isquemia y depende en menor medida del tipo de fibras que componen el músculo (Blaisdell, 2002).

En estos modelos se ha evaluado la función contráctil en condiciones isométricas (Fish, 1989; Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). Para contracciones en sacudida simple del músculo se han caracterizado: (1) la fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) (Fish, 1989; Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998), (2) el tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) (Fish, 1989; Woitaske & McCarter, 1998) (3) el tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) (Fish, 1989; Woitaske & McCarter, 1998) y (4) la tasa máxima de contracción ($(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$) (Fish, 1989). En modelos de isquemia hasta 4 horas con el músculo gastrocnemio (fibras tipo II), se ha reportado que la ΔF_{CSmax} y la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ tienen una correlación negativa (por encima de -0.8) con respecto al tiempo de duración de la isquemia (Fish, 1989). Por el contrario el ($\Delta t_{CScont.}$) y el ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) no muestran ningún cambio significativo con la isquemia ni con el tiempo de duración de la misma (Fish, 1989). Para las contracciones simples del músculo; (1) el tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$), (2) la tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) y (3) la integral fuerza_(contracción-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) no han sido evaluados hasta ahora.

En otros trabajos se ha evaluado la ΔF_{CSmax} en los músculos soleo (fibras tipo I - oxidativo) y extensor largo de los dedos (fibras tipo II - glicolítico) (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). En general, estos estudios indican que en los primeros 45 minutos de isquemia, la caída en ΔF_{CSmax} es mayor en los músculos oxidativos con respecto a los glicolíticos (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). Los músculos glicolíticos lucen sin embargo menos resistentes a tiempos prolongados de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997). Ambos tipos musculares muestran una considerable caída de la ΔF_{CSmax} en la primera hora de isquemia, con importante recuperación para ambos grupos musculares durante la primera hora de reperfusión (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). En ambos grupos musculares la ΔF_{CSmax} disminuye en la medida que aumenta el tiempo de isquemia y luego de dos horas en esta condición la recuperación de la ΔF_{CSmax} durante la primera hora de reperfusión es apenas cercana al 10% (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). Luego de tres horas de isquemia, la ΔF_{CSmax} no se recupera inmediatamente en ninguno de los grupos musculares y se observa a los 3 días una recuperación del 10% y a los 14 días una recuperación del 70 al 80%. La evidencia sugiere sin embargo, que esta recuperación tardía, obedece más a un proceso de hiperplasia celular a partir de células satélites, ya que en otros estudios se ha observado consistentemente que luego de 3 horas de isquemia, las células musculares entran en un proceso de necrosis irreversible, el cual normalmente es total e irreparable luego de 6 horas de isquemia (Blaisdell, 2002). No está claro si la hiperplasia celular juega un papel importante en la recuperación del músculo esquelético en humanos.

Para la contracción tetánica se han evaluado: (1) la fuerza tetánica máxima (ΔF_{Tmax}) (Fish, 1989; Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998), (2) el índice de fatiga ($I_{fatig.}$) (Fish, 1989; Woitaske & McCarter, 1998), (3) la integral fuerza_(tetánica)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{T(t)}$) (Gürke, et al., 2000), (4) el tiempo al 90% de la relajación de la fuerza máxima tetánica ($\Delta t_{TRel.90\%}$) (Gürke, et al., 2000) y (5) el índice de contracción ($\delta F_{Tcont.}/\delta t_{Tcont.})_{max} / F_{(\delta F_{Tcont.}/\delta t_{Tcont.})_{max}}$) (Gürke, et al., 2000). En este último estudio, luego de 3 horas de isquemia y 2 de perfusión la ΔF_{Tmax} , el $I_{fatig.}$, la $\int F_{T(t)}$, el $\Delta t_{TRel.90\%}$ y el $\delta F_{Tcont.}/\delta t_{Tcont.})_{max} / F_{(\delta F_{Tcont.}/\delta t_{Tcont.})_{max}}$, se encuentran todos disminuidos entre un 90 y 100% cuando los experimentos se realizan a 35 °C con el músculo peroneo (fibras tipo II) y el músculo soleo (fibras tipo I) (Gürke, et al., 2000). Sin embargo, cuando los experimentos se realizan a 30 °C con el músculo peroneo, tan solo la $\int F_{T(t)}$ disminuye en un 25% y los demás parámetros no se ven afectados por la isquemia-reperfusión (Gürke, et al., 2000). Para el caso del músculo soleo a 30 °C, se observa una caída entre el 50 y el 90% en todos los parámetros evaluados (Gürke, et al., 2000). Cuando los experimentos se llevan a cabo a 22 °C, no se observan diferencias significativas entre el grupo control y los dos tipos de músculos sometidos a isquemia-reperfusión, indicando que las bajas temperaturas podrían tener un efecto protector para la disfunción contráctil observada luego de traumas secundarios a isquemia-reperfusión.

Considerando: (1) que la utilización de modelos animales para el estudio del traumatismo secundario a isquemia-reperfusión en el músculo esquelético es validada por los aspectos éticos que impiden realizarlo directamente en humanos; (2) que la implementación de un modelo animal del traumatismo secundario a isquemia-reperfusión es de gran utilidad para evaluar e implementar terapias que puedan ser útiles para prevenir y minimizar las lesiones, el dolor y la limitación funcional, observadas durante situaciones clínicas tales como la enfermedad arterial periférica oclusiva, la oclusión vascular aguda seguida de revascularización durante procedimientos quirúrgicos y el trabajo muscular concéntrico de alta intensidad; (3) que la evaluación de la función contráctil en sacudida simple no se ha hecho de forma completa para músculos oxidativos y glicolíticos. En particular, parámetros como, (a) el tiempo de contracción ($\Delta t_{Scont.}$) (b) el tiempo medio de relajación ($\Delta t_{SRel.50\%}$) y (c) la tasa máxima de contracción ($\delta F_{Scont.}/\delta t_{Scont.})_{max}$, han sido evaluadas cada hora durante isquemia-reperfusión y parámetros como, (a) el tiempo de latencia ($\Delta t_{Slaten.}$), (b) la tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{S,Rel.}/\delta t_{S,Rel.})_{max}$) y (c) la integral fuerza_(contracción)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{S(t)}$), no han sido evaluados hasta ahora. En este trabajo de investigación hemos hecho una caracterización y una comparación de la función muscular del músculo soleo (predominantemente oxidativo) y del músculo extensor radial largo del carpo (predominantemente glicolítico) de ratas adultas, durante isquemia y perfusión. Concretamente, hemos buscado contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Cómo se modifican los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo soleo (oxidativo) y en el músculo extensor radial largo del carpo (glicolítico) de ratas Wistar adultas, durante 1, 2, y 3 horas de isquemia?
2. ¿Cómo se modifican los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo soleo (oxidativo) y en el músculo extensor radial largo del carpo (glicolítico) de ratas Wistar adultas, durante 1, 2, y 3 horas de isquemia seguidas de 1 hora de reperusión?
3. ¿Qué diferencias significativas se observan entre los parámetros de la contracción en sacudida simple del músculo soleo (oxidativo) y las del músculo extensor radial largo del carpo (glicolítico) de ratas Wistar adultas, obtenidas durante 1, 2, 3 horas de isquemia y seguidas de 1 hora de reperusión?

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las diferencias significativas en la función contráctil en sacudida simple durante isquemia y reperfusión entre músculos oxidativos y glicolíticos de ratas adultas.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1. Caracterizar los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo soleo (oxidativo) y en el músculo extensor radial largo del carpo (glicolítico) de ratas Wistar adultas, durante 1, 2 y 3 horas de isquemia.
- 2.2.2. Caracterizar los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo soleo (oxidativo) y en el músculo extensor radial largo del carpo (glicolítico) de ratas Wistar adultas, durante 1, 2 y 3 horas de isquemia seguidas de 1 hora de reperfusión.
- 2.2.3. Caracterizar las diferencias significativas que presentan los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple durante isquemia y reperfusión, entre el músculo soleo (oxidativo) y el músculo extensor radial largo del carpo (glicolítico) de ratas Wistar adultas.

3. MARCO TEORICO

3.1. Músculo esquelético.

El músculo esquelético nos permite el movimiento, la postura corporal y atender funciones tan importantes como la respiración (Berney & Levy, 2004). El músculo esquelético genera fuerza gracias a sus propiedades de excitabilidad, contractibilidad, elasticidad y extensibilidad (Leiber, 2004). En los humanos, el tejido muscular esquelético corresponde a un 60% de la masa corporal (Berney & Levy, 2004). El músculo esquelético está formado por células alargadas y cilíndricas que se denominan fibras musculares, las cuales, se organizan en fascículos y están separadas por varias capas de tejido conectivo que finalmente se fusionan en los tendones (Leiber, 2004). Las fibras musculares tienen la capacidad de generar fuerza y movimiento al transformar la energía química en energía mecánica (Berney & Levy, 2004). La fibra muscular, es una célula fusiforme, multinucleada y estriada, con un diámetro entre 10 y 100 μm y una longitud de varios centímetros (Leiber, 2004). La membrana celular se denomina sarcolema y el citoplasma se denomina sarcoplasma. La fibra muscular contiene además, tubulos T, retículo sarcoplasmático, mitocondrias, mioglobina y un complejo arreglo de proteínas organizadas en miofilamentos de actina y de miosina, los cuales pueden interactuar físicamente para producir un aumento en la tensión de las fibras musculares (Berney & Levy, 2004).

Todos los músculos del cuerpo están conformados por una mezcla heterogénea de fibras de contracción rápida de baja resistencia y de contracción lenta de alta resistencia (Berney & Levy, 2004). Esta diversidad le permite a los músculos participar en una variedad de tareas, tales como, realizar contracciones sostenidas durante largos periodos de tiempo para que podamos permanecer de pie, o contraerse explosiva y rápidamente para que podamos saltar un obstáculo (Leiber, 2004). Las fibras musculares son inervadas por motoneuronas ubicadas en el asta anterior de la médula espinal, (Berney & Levy, 2004). A través de estas motoneuronas, el sistema nervioso central envía impulsos nerviosos al músculo esquelético para estimular su contracción voluntaria (Berney & Levy, 2004). De otro lado, las arterias proporcionan al tejido muscular los nutrientes y el oxígeno necesarios para su funcionamiento normal (Leiber, 2004) y las venas eliminan del músculo los desechos metabólicos que resultan del trabajo muscular, tales como el ácido láctico y el dióxido de carbono (Leiber, 2004).

3.2. Excitabilidad del músculo esquelético.

La contracción del músculo esquelético es un proceso fisiológico por el cual, en respuesta a un estímulo excitatorio, el músculo desarrolla tensión y se acorta (contracción isotónica concéntrica), se estira (contracción isotónica excéntrica) o permanece de la misma longitud (contracción isométrica) (Leiber, 2004). La gran mayoría de los músculos esqueléticos de los mamíferos contienen fibras de sacudida simple, debido a que en respuesta a la estimulación nerviosa,

generan un potencial de acción que se propaga por el sarcolema causando una contracción transitoria, denominada sacudida simple (Leiber, 2004). La contracción tetánica ocurre cuando el músculo es excitado por un tren de potenciales de acción que genera una contracción sostenida del mismo. En los humanos, los músculos de fibras rápidas son excitados fisiológicamente máximo a frecuencias de 30 Hz y los de fibras lentas a frecuencias de 10 Hz (Leiber, 2004). Estas frecuencias son suficientes para obtener un tétanos fusionado, cercano a la fuerza máxima del músculo (Leiber, 2004).

La contracción muscular concéntrica se produce por el deslizamiento de los miofilamentos delgados de actina sobre los miofilamentos gruesos de miosina hacia el centro de la sarcómera (Moss, Diffie & Greaser, 1995). La contracción muscular es regulada por el calcio (Ca^{2+}) intracelular y por el complejo molecular de ATP y magnesio (Mg^{2+}) (Gastin, 2001). En el reposo, las fuerzas naturales de atracción entre los miofilamentos de actina y miosina están inhibidas por la interposición mecánica del complejo troponina-tropomiosina (Moss, Diffie & Greaser, 1995). Una vez los potenciales de acción llegan al terminal axónico de la motoneurona que inerva la fibra muscular, el potencial de acción activa los canales iónicos de Ca^{2+} dependientes de voltaje en el terminal axónico, lo cual aumenta la entrada de Ca^{2+} al interior del terminal (Gastin, 2001). El Ca^{2+} promueve la liberación del neurotransmisor acetilcolina hacia la hendidura sináptica (Gastin, 2001). La acetilcolina es sintetizada y almacenada en vesículas, unas 300.000 por placa motora (Leiber, 2004). El potencial de acción de la motoneurona provoca la liberación de aproximadamente 125 vesículas de acetilcolina (Leiber, 2004).

La acetilcolina se une a receptores nicotínicos ubicados en la entrada de los pliegues de la membrana postsináptica en el sarcolema. El receptor nicotínico es una proteína de 275 kDa, la cual está conformada por 5 subunidades que en conjunto forman un canal iónico en el sarcolema (Leiber, 2004). El poro del canal, que normalmente permanece cerrado, se abre cuando dos moléculas de acetilcolina se unen a las dos subunidades alfa del receptor, lo cual provoca un cambio conformacional que abre el canal iónico (Leiber, 2004). Cuando este canal iónico del receptor nicotínico está abierto, pueden pasar a través suyo los cationes monovalentes sodio (Na^+) y potasio (K^+), pero debido a la fuerza electromotriz en reposo, fluyen muchos más iones Na^+ , lo cual hace que el sarcolema se despolarice desde -90 mV hacia un valor cercano a 0 mV (Berney & Levy, 2004). Este potencial sináptico promueve la apertura de los canales de Na^+ dependientes de voltaje en el sarcolema ($\text{Na}_{V1.4}$) (Cohen et. al., 2207), lo cual inicia un potencial de acción en la fibra muscular que se propaga por todo el sarcolema con una velocidad de 2 a 6 m/s e invade los túbulos T y se propaga por ellos a una velocidad de 0.3 m/s, hacia el interior de las fibras musculares (Bennetts, Parker & Cromer, 2007). La densidad de los $\text{Na}_{V1.4}$ es más alta en las fibras rápidas que en las fibras lentas. La densidad es 3 veces mayor en la placa neuromuscular que en otras partes del sarcolema (Bennetts, Parker & Cromer, 2007). Durante el potencial de acción, inmediatamente después de los $\text{Na}_{V1.4}$, se abren los canales de K^+ dependientes del voltaje (K_V), los cuales se encargan de repolarizar el sarcolema nuevamente hasta el

potencial eléctrico de reposo de la fibra muscular (Bennetts, Parker & Cromer, 2007). La excitación del sarcolemma y los túbulos T, desencadena posteriormente el proceso de contracción muscular a través del mecanismo de acoplamiento entre la excitación y la contracción (Gastin, 2001). La acetilcolina activa receptores nicotínicos mientras se mantenga en el espacio sináptico. Unida a la matriz de la lámina basal del sarcolemma se encuentra la acetilcolinesterasa, enzima que degrada la acetilcolina y termina la excitación sináptica del músculo (Berney & Levy, 2004).

El potencial de reposo (V_m) del sarcolemma de las fibras musculares esqueléticas de mamíferos está determinado por la permeabilidad en el reposo a los iones cloruro (Cl^-) y K^+ (Bennetts, Parker & Cromer, 2007). En el reposo, el 20% de la conductancia es llevada por el K^+ , a través de canales rectificadores de entrada (K_{ir}) que previenen una hiperpolarización profunda del sarcolemma, ayudando a estabilizar el V_m en -90 mV (Bennetts, Parker & Cromer, 2007). Estos canales están densamente ubicados en la membrana de los túbulos T (Bennetts, Parker & Cromer, 2007). El 80% restante de la conductancia en reposo es llevada por el Cl^- , cuya gran mayoría es transportada por el canal ClC1 (Bennetts, Parker & Cromer, 2007). Este canal es levemente dependiente del potencial eléctrico de la membrana (Bennetts, Parker & Cromer, 2007). Esta conductancia de Cl^- , previene la inactivación acumulada de los $\text{Na}_{v1.4}$ cuando el músculo es excitado a altas frecuencias (Berney & Levy, 2004). Ciertamente, si el V_m dependiera exclusivamente del K^+ , a mayor K^+ extracelular, el V_m se despolarizaría y los $\text{Na}_{v1.4}$ se comenzarían a inactivar, haciendo menos excitable la fibra muscular (Bennetts, Parker & Cromer, 2007). De otro lado, en condiciones fisiológicas, se requiere que la magnitud de las corrientes de Na^+ sean grandes para poder sobrepasar la alta conductancia de reposo al Cl^- y así poder despolarizar el sarcolemma (Bennetts, Parker & Cromer, 2007). Varios tipos de canales de K^+ se han descrito en la membrana de las fibras musculares esqueléticas. Entre ellos podemos mencionar varios tipos de canales de K^+ rectificadores de salida (K_v), que serían importantes en la fase de repolarización del potencial de acción (Vázquez-García & Reyes-Guerrero G, 2009). Así mismo, los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}), que tenderían a repolarizar el sarcolemma más rápidamente cuando aumenta el Ca^{2+} en el sarcoplasma (Favero *et al.*, 2008). Entre ellos cabe destacar la presencia de los canales B_K o $\text{K}_{Ca1.1}$, los cuales están ampliamente distribuidos por el sarcolemma y los tubulos T (Favero *et al.*, 2008). Finalmente canales de K^+ regulados por el ATP intracelular (K_{ATP} o $\text{K}_{ir6.2}$) están densamente ubicados en el sarcolemma de la fibra y menos en la membrana de los túbulos T (Nielsen *et al.*, 2003). Al abrirse, estos canales tenderían a repolarizar el potencial eléctrico del sarcolemma cuando disminuye la concentración intracelular de ATP, acoplando el potencial eléctrico de la membrana al metabolismo celular (Nielsen *et al.*, 2003).

3.3. Acoplamiento excitación – contracción muscular y liberación de Ca^{2+} .

En la fibra muscular esquelética de los mamíferos los potenciales de acción penetran por los túbulos T (Clausen, 2003). En la membrana de los túbulos se

encuentran canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (receptores de dihidropiridinas - DHPR) (Cheng & Lederer, 2008). La gran mayoría de estos receptores de DHPR no permiten el paso del Ca^{2+} (Cheng & Lederer, 2008). Se conoce que los receptores de DHPR están acoplados físicamente con los canales de Ca^{2+} independientes de voltaje del retículo sarcoplasmático (RS) (receptores de ryanodina tipo 1 – RyR1) (Cheng & Lederer, 2008). El Ca^{2+} almacenado en las cisternas del RS, sale al sarcoplasma a través de los RyR1 en función de su gradiente de concentración (Cheng & Lederer, 2008).

El aumento de la concentración de Ca^{2+} , desde 100 nM hasta 200 μM , induce la unión del Ca^{2+} a la troponina C (Cheng & Lederer, 2008). Esta unión desestabiliza el complejo troponina-tropomiosina (Moss, Diffie & Greaser, 1995). Los movimientos de la troponina y la tropomiosina exponen sitios activos en los miofilamentos de actina a los que se unen las cabezas pesadas de los miofilamentos de miosina (Moss, Diffie & Greaser, 1995). En otros sitios de las cabezas pesadas de la miosina, una miosina ATPasa, hidroliza ATP y libera la energía suficiente para que las cabezas de miosina hagan un giro, desde los 45° hasta los 90° . Este giro aumenta la afinidad de la miosina por la actina, las cuales se unirán siempre y cuando haya Ca^{2+} presente y el complejo troponina-tropomiosina esté desplazado de su posición de reposo (Cheng & Lederer, 2008). Una vez se da la unión, se libera energía y la cabeza pesada de miosina vuelve a girar desde los 90° hacia los 45° , moviendo los miofilamentos delgados de actina hacia el centro de la sarcómera (Gastin, 2001). En este punto, las cabezas de miosina se soltarán de los filamentos delgados de actina por efecto de la presencia de ATP (Gastin, 2001). Si el Ca^{2+} aun está elevado en el sarcoplasma, el ciclo de reacciones se reinicia y el proceso se puede repetir cíclicamente (Gastin, 2001). Se considera que mientras el Ca^{2+} permanece elevado en el sarcoplasma, lo cual depende de la llegada de nuevos potenciales de acción a los túbulos T, las cabezas pesadas de miosina seguirán hidrolizando ATP y desplazando los miofilamentos de actina hacia el centro de la sarcómera, prolongando la contracción muscular (Clausen, 2003).

En condiciones fisiológicas, la liberación de Ca^{2+} desde el RS en el músculo esquelético, está mediada fundamentalmente por un mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por la despolarización de los túbulos T (DICR) (Cheng & Lederer, 2008). Se ha establecido que la cantidad de Ca^{2+} que es liberada por cada potencial de acción se mantiene relativamente constante, aun si la cantidad de Ca^{2+} dentro del retículo aumenta considerablemente (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Se considera que hay tres factores que contribuyen a mantener constante la cantidad de Ca^{2+} liberado: (1) el Ca^{2+} liberado causa una inactivación dependiente del mismo Ca^{2+} en el RyR1, (2) el Ca^{2+} liberado acelera la desactivación de los DHPR adyacentes y (3) el Ca^{2+} liberado acorta la duración del potencial de acción por medio de la activación de canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) (Allen, Lamb & Westerblad, 2008).

El fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (CICR) que fue descubierto originalmente en fibras aisladas del músculo esquelético, hoy día

se considera que no es fisiológico en este músculo (Endo, 2009). Ciertamente, en el músculo esquelético se ha observado que la señal iniciada por la DICR no se amplifica en forma de “spark”, tal como se ha establecido plenamente para el músculo cardíaco (Cheng & Lederer, 2008). El “spark” se puede definir como el evento cuántico de CICR que se puede registrar desde una “unidad liberadora de Ca^{2+} (CRU)” (Cheng & Lederer, 2008). El CRU se refiere a un grupo de receptores de ryanodina organizados en forma de aglomerado en una región particular del retículo. En el músculo esquelético de mamíferos, se ha observado que estos aglomerados están conformados por los RyR1, organizados en una doble línea central en la cisterna, acoplados a tétradas alternantes de DHPRs (Cheng & Lederer, 2008). Los RyR1 son capaces de soportar tanto la CICR como la DICR (Endo, 2009).

En el músculo esquelético de mamíferos se han observado “sparks” durante el envejecimiento (“ghost sparks”), mientras que en el músculo de adultos normales, las señales fundamentales de Ca^{2+} que se han observado se denominan “embers” (Cheng & Lederer, 2008). Estos “embers” son señales de Ca^{2+} de baja amplitud y larga duración y posiblemente reflejan la apertura prolongada de los CRUS (Cheng & Lederer, 2008). Un “spark” alcanza su pico entre 5 y 10 ms, decae en 20 ms y tiene un ancho en el 50% del pico de 1 microm. Un “ember” normalmente tiene la mitad de la amplitud de un “spark”, alcanza su pico en 5 ms, se mantiene en una meseta de 40 ms, decae en 55 ms y tiene un ancho en el 50% del pico de 0.5 microm (Cheng & Lederer, 2008). Considerando que los “embers” son dependientes de voltaje y no de Ca^{2+} , se postula actualmente que la CICR no contribuye de manera importante a la liberación fisiológica de Ca^{2+} desde el RS durante la contracción del músculo esquelético (Endo, 2009). Según este punto de vista actual, la CICR se podría observar en condiciones de funcionamiento anormal del músculo esquelético (Cheng & Lederer, 2008; Endo, 2009). Por ello es importante mantener presente que la CICR es bifásica en función del Ca^{2+} , es potenciada por el ATP y puede ser bloqueada por el Mg^{2+} (Endo, 2009).

3.4. Relajación de la contracción.

Una vez el Ca^{2+} aumenta su concentración en el sarcoplasma, la bomba de Ca^{2+} tipo SERCA, comienza a bombear el Ca^{2+} de regreso hacia el interior del RS (Green *et al.*, 1996). Esta bomba puede concentrar unas 10.000 veces el Ca^{2+} en estas cisternas (Green *et al.*, 1996). En el músculo esquelético de los humanos se expresan preferentemente dos isoformas, las SERCA1a y la SERCA2a (Tupling, 2009). Esta bomba de Ca^{2+} es activada cuando aumenta la actividad muscular por la PKA y una calmodulina-kinasa dependiente de Ca^{2+} . La SERCA 1a constituye más del 90% de las bombas expresadas en las fibras musculares tipo II (sacudida rápida o glicolíticas) (Tupling, 2009). Entre tanto la SERCA2a es la bomba más abundantemente expresada en las fibras musculares tipo I (sacudida lenta o oxidativas) (Tupling, 2009). Las SERCA 1a bombean el Ca^{2+} tres veces más rápido que las SERCA2a (Green *et al.*, 1996).

En condiciones fisiológicas, las bombas tipo SERCA son reguladas por las proteínas reguladoras fosfolamban (PLN) y sarcolipina (SLN) (Tupling, 2009). Recientemente se ha encontrado una interacción entre las bombas tipo SERCA y la proteína inducida por “shock” térmico (Hsp70), lo cual sugiere un papel regulatorio de la actividad de óxido-reducción en la célula y la actividad de las bombas tipo SERCA (Tupling, 2009). La evidencia sugiere que los radicales superóxido que se generarían durante un proceso de reperfusión vascular aumentarían la actividad y la expresión de las bombas tipo SERCA (Tupling, 2009). La expresión de PLN y SLN en los diferentes tipos musculares no está completamente aclarada y la evidencia indica que esta expresión es específica de cada especie de animales (Tupling, 2009). El PLN, que normalmente se expresa en fibras tipo I, inhibe la actividad de la bomba de Ca^{2+} , pero cuando es fosforilado por la PKA y la Ca^{2+} -calmodulina quinasa-II, la actividad inhibitoria se remueve, dejando la bomba activa a concentraciones sub-máximas de Ca^{2+} intracelular (Tupling, 2009). La expresión del PLN ha sido cuestionada en el músculo soleo de rata (Tupling, 2009). De otro lado, la SLN si está ampliamente expresada en los diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas, particularmente en el músculo soleo, pero su papel fisiológico no está claro (Tupling, 2009). Su papel no ha sido estudiado en el músculo esquelético, pero por analogía con los hallazgos en el músculo cardiaco, se presume que podría tener un rol fisiológico similar al del PLN (Tupling, 2009).

La transferencia de Ca^{2+} al RS disminuye su concentración en el sarcoplasma y así disminuye la cantidad de Ca^{2+} unido a la troponina C (Green *et al.*, 1996). La disminución del Ca^{2+} induce un cambio conformacional en el complejo troponina-tropomiosina, el cual se mueve y se posiciona nuevamente sobre el sitio de alta afinidad de la actina por la miosina, impidiendo la formación del complejo actina-miosina, lo que promueve la relajación del músculo esquelético (Green *et al.*, 1996). Otro factor que contribuye a aumentar la tasa de remoción de Ca^{2+} del sarcoplasma es la presencia de la proteína parvalbumina (~1 mM) (Tupling, 2009). Esta proteína está presente en el sarcoplasma de las fibras musculares tipo II (sacudida rápida o glicolíticas) (Tupling, 2009). Las fibras musculares tipo I (sacudida lenta o oxidativas) carecen de parvalbumina (Tupling, 2009). Si bien los murinos presentan parvalbumina, el músculo esquelético de los humanos aparentemente no presenta parvalbumina (Tupling, 2009).

De otro lado, se ha calculado que el RS ocupa aproximadamente el 10% del volumen celular total en los músculos glicolíticos y el 5% en los músculos oxidativos. En el interior del RS la calsecuestrina (CSQ1) tampona el Ca^{2+} , disminuyendo la concentración de Ca^{2+} libre intra-reticular (Green *et al.*, 1996). Se ha calculado que la concentración de CSQ1 es cuatro veces superior en el músculo extensor largo de los dedos (glucolítico) con respecto al músculo soleo (oxidativo) (Murphy *et al.*, 2009). Con base en estos cálculos se ha estimado que el contenido máximo de Ca^{2+} sería de 21 mM en el músculo extensor largo de los dedos (glucolítico) y de 11 mM en el músculo soleo (oxidativo) (Murphy *et al.*, 2009). Pese a esta capacidad, se ha determinado que el contenido de Ca^{2+} endógeno en ambos tipos de fibras musculares es igual y está alrededor

de 1 mM (Murphy *et al.*, 2009). Esto indica que el RS del músculo soleo se encuentra cargado de Ca^{2+} al 70% de su capacidad total, mientras que el músculo glicolítico está cargado a un 25% de su capacidad total (Tupling, 2009). Así mismo, se ha calculado que la concentración de Ca^{2+} libre en el RS de los músculos glucolíticos es de 0,3 mM y en los músculos oxidativos como el soleo es de 1 mM, posiblemente reflejando en los músculos glicolíticos un mayor nivel de fuga basal de Ca^{2+} hacia el sarcoplasma a través de la bomba de Ca^{2+} tipo SERCA (Allen, Lamb & Westerblad, 2008).

El papel del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la homeostasis de Ca^{2+} de la fibra muscular esquelética se considera marginal y básicamente restringido a retirar el Ca^{2+} hacia el exterior cuando el mismo alcanza altas concentraciones en el sarcoplasma (Cifuentes, Vergara & Hidalgo, 2000). Su papel en el músculo esquelético de mamíferos no se ha explorado (Cifuentes, Vergara & Hidalgo, 2000). La bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) parece igualmente jugar un papel marginal, básicamente ayudando a mantener las concentraciones basales de Ca^{2+} durante el reposo celular (Tupling, 2009).

3.5. Entrada de Ca^{2+} .

Pese a que se ha observado que la contracción muscular es independiente del Ca^{2+} externo (Endo, 2009), recientemente se han identificado al menos dos posibles mecanismos que permiten la entrada de Ca^{2+} a través del sarcolema en el músculo esquelético. En 2001 se identificó una vía de entrada de Ca^{2+} dependiente del vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} ("store-operated Ca^{2+} entry" - SOCE) (Cheng & Lederer, 2008). En el músculo esquelético se ha demostrado la presencia de las moléculas que son responsables del SOCE en linfocitos. Así, se ha identificado la presencia de STIM1 ("stromal interaction molecule 1") y de los canales iónicos Orai1 (Cheng & Lederer, 2008). Según el modelo actual aceptado de funcionamiento, STIM1 se expresa en la membrana del RS, teniendo un dominio de afinidad por Ca^{2+} hacia la luz de las cisternas del RS. Cuando este dominio está ocupado por Ca^{2+} (retículo lleno de Ca^{2+}), las moléculas de STIM1 difunden libremente por la membrana del RS. Orai1 se expresa en el sarcolema y difunde libremente por esta membrana, mientras el retículo esté lleno de Ca^{2+} (Cheng & Lederer, 2008). Una vez el RS disminuye su carga de Ca^{2+} , las moléculas de STIM1 se oligomerizan en la membrana del RS. Esta oligomerización promueve a su vez la oligomerización de las subunidades de Orai1. Cuatro subunidades de Orai1 formarían un canal de Ca^{2+} funcional con una conductancia pequeña de 25 fA. El Ca^{2+} que entra al sarcoplasma es capturado inmediatamente por la bomba de Ca^{2+} tipo SERCA y llevado al interior del RS, recargando así este organelo de Ca^{2+} (Cheng & Lederer, 2008).

En 2004 se identificó una vía independiente de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} ("excitation-coupled Ca^{2+} entry" - ECCE) (Cheng & Lederer, 2008). Se ha propuesto que el mecanismo del ECCE está controlado por una interacción entre los RyR1 y algunos canales tipo TRPC ("canonical transient receptor potential"). Sin embargo, el mecanismo propuesto para el ECCE más aceptado,

sugiere que este fenómeno ocurre por medio de las interacciones entre el receptor de DHPR y los receptores de RyR1, los cuales soportan el fenómeno de DICR (Cheng & Lederer, 2008). Si bien el ECCE se beneficiaría de la interacción entre estas dos macromoléculas, la entrada de Ca^{2+} se daría a través de un canal de Ca^{2+} tipo L dependiente de voltaje similar al DHPR, pero conductivo (Cheng & Lederer, 2008). Este último canal estaría asociado al complejo DHPR-RyR1 en algunas regiones discretas, permitiendo la entrada de Ca^{2+} al sarcoplasma, inducida por la despolarización del sarcolema y la activación del fenómeno de DICR (Cheng & Lederer, 2008). Es importante anotar que este fenómeno de ECCE, solo se ha observado posterior a la activación repetitiva del DICR.

La entrada de Ca^{2+} por estas dos vías sería fundamental para mantener elevadas las reservas de Ca^{2+} en el SR durante el funcionamiento normal del músculo. Sin embargo, podrían ser igualmente importantes en el desarrollo del músculo (Stiber *et al.*, 2008) y durante estados como la fatiga (Pan *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2005), el envejecimiento (Zhao *et al.*, 2008) y en patologías como la distrofia muscular (Vandebrouck *et al.*, 2002) y la hipertermia maligna (Zhao *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Cherednichenko *et al.*, 2008).

3.6. Energética de la contracción muscular.

Las fibras musculares contienen aproximadamente entre 5.5 y 7 mM de ATP, concentración que parece suficiente para mantener la contracción muscular durante unos 2 segundos (Leiber, 2004). La actividad contráctil induce permanentemente la hidrólisis del ATP, formando ADP, el cual es fosforilado nuevamente en una fracción de segundo para mantener estable la concentración de ATP (Berney & Levy, 2004). Esta renovación del ATP se basa en varias reservas de energía. La primera reserva es la fosfocretina (PCr) cuya cantidad normal es unas 5 veces mayor que la del ATP. Se considera que la energía combinada del ATP y de la PCr es capaz de producir una contracción máxima del músculo esquelético durante 5 a 8 segundos (Leiber, 2004). La segunda reserva de energía es el glucógeno muscular. La rápida degradación enzimática del glucógeno para liberar glucosa y llevarla hasta ácido pirúvico libera energía para convertir ADP en ATP, el cual puede ser utilizado directamente para proporcionar energía a la contracción muscular o para volver a cargar los depósitos energéticos de PCr (Berney & Levy, 2004). La importancia de este segundo mecanismo es doble, por una parte, las reacciones tienen lugar en ausencia de oxígeno y por otro lado, la velocidad de formación de ATP es dos y media veces más rápida que cuando los nutrientes son oxidados (Leiber, 2004). La acumulación de productos finales de la glucólisis es tan elevada que por sí sola puede mantener una contracción muscular máxima durante más de 1 minuto. Una fuente de energía alternativa proviene del metabolismo oxidativo (Berney & Levy, 2004). Más del 95 % de la energía puede proceder de esta fuente cuando el músculo está capacitado para ello. Los principales nutrientes consumidos son carbohidratos, grasas y excepcionalmente proteínas (Berney & Levy, 2004). En caso de actividad muscular máxima, durante muchas horas, la mayor proporción de energía

procede de las grasas pero, para períodos de 2 a 4 horas, hasta la mitad de la energía puede proceder del glucógeno almacenado (Berney & Levy, 2004).

3.7. Fibras musculares tipo I y tipo II.

Los músculos tipo I (sacudida lenta) se distinguen de los tipo II (sacudida rápida) por su color rojo, menor velocidad de contracción y mayor resistencia a las contracciones repetidas (menor fatigabilidad) (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). El color rojo se debe a los altos niveles de mioglobina que contienen las fibras tipo I y por la mayor densidad de capilares que los irrigan (Leiber, 2004). Las fibras lentas tienen alta densidad de mitocondrias, son altamente oxidativas con baja capacidad glucolítica, tienen la mitad del contenido de túbulos T y RS y contienen las isoformas lentas de las proteínas contráctiles (Leiber, 2004; Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Estas fibras tipo I están capacitadas para realizar metabolismo oxidativo (Berney & Levy, 2004). Las fibras blancas o tipo II son de mayor tamaño y tienen menor cantidad de mioglobina, bajas cantidades de mitocondrias y de capilares, altas concentraciones de enzimas glucolíticas, una relativamente alta densidad de túbulos T y de RS y de isoformas de la cabeza pesada de miosina que son rápidas, tropomiosina y troponina (Leiber, 2004; Allen, Lamb & Westerblad, 2008), por lo cual están más capacitadas para realizar metabolismo glucolítico.

Estudios bioquímicos indican que el ritmo y capacidad de transportar Ca^{2+} , la actividad y la cantidad de las bombas tipo SERCA, la formación de fosfoproteína y la actividad de desfosforilación, son más bajos en RS de fibras tipo I (Leiber, 2004; Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Las características funcionales del músculo dependen entonces de su metabolismo, su capacidad de manejo del Ca^{2+} y de su velocidad de hidrólisis del ATP (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Las fibras I tienen una tasa lenta de actividad de miosina ATPasa, lo cual reduce la demanda de energía (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Esto, junto con su baja capacidad de manejo del Ca^{2+} , crea fibras con lento desarrollo de tensión pero muy resistentes a la fatiga (Leiber, 2004). En el otro lado están fibras que tienen altas tasas de miosina ATPasa y de manejo del Ca^{2+} pero bajas capacidades oxidativas (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Estas fibras tienen rápida velocidad de desarrollo de tensión y relajación pero son rápidamente fatigables (Leiber, 2004). Las fibras se caracterizan por su capacidad contráctil. En registros de sacudida simple se ha medido la fuerza máxima, el tiempo de contracción y el tiempo medio de relajación (Leiber, 2004). La fuerza es más pequeña en músculos con predominio de fibras tipo I (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Los tiempos de contracción y relajación son más breves en músculos con predominio de fibras tipo II (Leiber, 2004; Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Los lentos tetanizan a frecuencias menores y desarrollan menor fuerza (Allen, Lamb & Westerblad, 2008).

3.8. Síndrome isquemia-reperfusión del músculo esquelético.

Las lesiones del músculo esquelético secundarias al traumatismo mediado por isquemia-reperfusión se presentan en diversas situaciones clínicas tales como:

(1) la enfermedad arterial periférica oclusiva (Pipinos et al., 2007; Pipinos et al., 2008), la cual se considera que a nivel mundial puede afectar entre un 15 y un 20% de los sujetos mayores de 70 años (Martínez, 2009), (2) la oclusión vascular aguda seguida de revascularización durante la cirugía vascular electiva, durante la cirugía ortopédica que implica la utilización de un torniquete y durante los trasplantes que contienen tejido muscular esquelético (Schellong, Ockert, y Zimmermann, 1998; Khanna, Cowled & Fitridge, 2005), y (3) durante el trabajo muscular concéntrico de alta intensidad (Graven-Nielsen & Arendt-Nielsen, 2008).

La isquemia se define como la falta parcial o total de aporte de sangre a un órgano o a parte de él, producida por una alteración patológica de sus arterias aferentes (Carden & Granger, 2000). La causa más frecuente es una obstrucción arterial, aunque también puede darse por insuficiencia circulatoria periférica (Carden & Granger, 2000). Las causas locales pueden estar en el lumen, en la pared o por fuera de la arteria. Entre las primeras están la trombosis y la embolia, particularmente importantes en arterias de mediano y pequeño calibre. La alteración de la pared más frecuente es la aterosclerosis: la placa aterosclerótica, por una parte, puede provocar una trombosis cuando se ulcera; por otra parte, cuando predomina el componente fibroso puede producir una estenosis por retracción de los tejidos (Carden & Granger, 2000). Otra causa parietal está representada por los espasmos, los cuales han sido observados en arterias cerebrales y coronarias. Entre las causas extrínsecas están la compresión, el pinzamiento quirúrgico y la torsión de la arteria. Los efectos de la isquemia dependen de diversos factores, tales como: (1) la duración, (2) la intensidad de la isquemia, (3) la rapidez con que se instala, (4) el grado de sensibilidad de los tejidos y (5) la disposición anatómica del árbol vascular (Carden & Granger, 2000).

En términos de duración, la isquemia puede ser transitoria o persistente (Carden & Granger, 2000). La intensidad depende del grado de obstrucción arterial y puede ser absoluta en caso de oclusión o isquemia relativa en caso de obstrucción parcial (Blaisdell, 2002). En general, los infartos son consecuencia de una isquemia por oclusión (Carden & Granger, 2000). La isquemia aguda es normalmente más grave que la crónica (Carden & Granger, 2000). Cuando se produce crónicamente puede permitir el desarrollo de colaterales y de anastomosis (Carden & Granger, 2000). En cuanto a su sensibilidad, las células muestran diferentes tiempos de sobrevida a la isquemia. Las neuronas mueren luego de 5 minutos, los miocitos cardíacos pueden resistir hasta 30 minutos, las células renales hasta 1 hora y las células musculares esqueléticas entre 3 y 6 horas (Carmo-Araújo et. al, 2007). Desde el punto de vista morfológico las consecuencias de la isquemia pueden ser: ninguna, necrosis electiva parenquimatosa, infarto o atrofia según como se den los factores indicados (Blaisdell, 2002). Los efectos funcionales de la isquemia sobre los diferentes tejidos son objeto de estudio actualmente.

La reperusión ocurre cuando el flujo sanguíneo retorna a un tejido después de un periodo de isquemia (Carden & Granger, 2000). Aunque permite la

recuperación del tejido, limitando la necrosis post-isquémica, se ha descrito que la reperusión puede en si misma lesionar los tejidos, ocasionando la “lesión por reperusión” y en ocasiones la necrosis por reperusión (observada usualmente en el miocardio) (Carden & Granger, 2000). Los efectos de la lesión por reperusión dependen, entre otros, de los daños causados por la isquemia y del grado de sensibilidad de cada tejido (Carden & Granger, 2000). Se conoce que el daño se debe en parte a la respuesta inflamatoria que se produce en los tejidos afectados por la isquemia (Ma, Qui y Chen, 2008). Los leucocitos que entran al tejido durante la reperusión liberan interleuquinas y radicales libres (hidroxilo, superóxido, entre otros) en respuesta al daño tisular producido por la isquemia (Ma, Qui y Chen, 2008). Las interleuquinas promueven la respuesta inflamatoria y los radicales libres tienden a dañar las proteínas celulares, el ADN y la membrana plasmática de las células que sobrevivieron a la isquemia (Ma, Qui y Chen, 2008). La muerte de nuevas células induce la liberación de más radicales libres. La inflamación, si se vuelve crónica, puede finalmente reproducir la isquemia, por extravasación de fluidos (edema) y estasis sanguíneo (aumento de la viscosidad) (Carden & Granger, 2000). Adicionalmente, en el músculo cardíaco, se ha observado que en los primeros 5 a 15 minutos de reperusión, se desarrolla una hiper-contractura, la cual tiende a favorecer la lesión de las células cardíacas durante la etapa de reperusión (Piper, Abdallah y Schäfer, 2004).

Durante la isquemia hay una disminución del aporte de oxígeno y de glucosa al músculo esquelético (Carden & Granger, 2000). Se supone que este proceso tiene como consecuencia la reducción gradual de los depósitos energéticos intracelulares y el aumento del metabolismo anaeróbico (Blaisdell, 2002). A nivel celular el traumatismo por isquemia-reperusión se ha descrito que puede llevar a procesos de daño de la membrana celular, edema, disfunción microvascular y necrosis muscular, lo cual está asociado con procesos de morbilidad y disfunción definitiva del tejido muscular. (Rubin *et al.*, 1996; Blaisdell, 2002). A nivel metabólico se ha descrito una reducción gradual de los depósitos energéticos intracelulares de ATP, de PCr, de glucógeno muscular, con aumentos en las concentraciones intracelulares de lactato y H^+ (Carvalho, McKee & Green, 1996; Blaisdell, 2002). El traumatismo por isquemia-reperusión así mismo, se ha reportado que induce en el músculo esquelético condiciones de hipoxia, hipercapnia y acumulación a nivel extracelular de metabolitos como ATP, adenosina, H^+ , lactato, hipoxantina y colina, entre otros (Carvalho, McKee & Green, 1996; Korth *et al.*, 2000; Mense, 2009).

El dolor muscular secundario a isquemia se presenta generalmente por la acumulación de algunos de estos metabolitos (Mense, 2009). Estudios realizados en humanos sugieren que este tipo de dolor está relacionado en parte con la liberación de protones y de ATP desde las fibras musculares al espacio extracelular (Forrester, 1972). Se considera que varios cuadros clínicos asociados con dolor presentan orígenes de tipo isquémico. Tal es el caso del dolor asociado con la claudicación intermitente de los miembros inferiores, el dolor de espalda, la mialgia cervical, la cefalea tensional, los dolores producidos en las primeras 24 horas que siguen al ejercicio físico concéntrico

extenuante y el dolor secundario a trombo embolismos (Mense, 2009). Así mismo, en algunos procedimientos quirúrgicos se pueden presentar etapas alternantes de isquemia y reperfusión (Carvalho, McKee & Green, 1996).

3.9. Mecanismos de lesión muscular en los procesos de isquemia-reperfusión.

Dentro de las respuestas musculares secundarias a períodos de isquemia y reperfusión, los estudios han caracterizado tres niveles: (1) cambios celulares y tisulares, (2) cambios metabólicos y (3) cambios en la función muscular. En el músculo esquelético, los procesos de isquemia y reperfusión llevan a la aparición de edema, disfunción microvascular, inflamación y necrosis muscular, todo lo cual está asociado con procesos de morbilidad y disfunción irreversible del músculo esquelético (Rubin *et al.*, 1996; Carden & Granger, 2000). Todas las investigaciones relacionadas con la lesión muscular durante reperfusión enfatizan que todos los cambios observados son causados por diferentes mecanismos, lo cual dificulta la implementación de terapias efectivas para la adecuada recuperación del músculo (Carvalho, McKee & Green, 1996). Actualmente los procesos de isquemia-reperfusión son vistos como una forma de inflamación aguda (Rubin *et al.*, 1996), pero no hay consenso al respecto (Carvalho, McKee & Green, 1996).

Debido a lo anterior, se ha evaluado la medición del infiltrado de células inflamatorias, la medición de la adhesión de leucocitos y la medición de las concentraciones de histamina, leucotrienos, radicales libres y el factor de necrosis tumoral, entre otros (Carden & Granger, 2000). Un estudio histológico en el cual se caracterizó el efecto de 4 horas de isquemia y diferentes tiempos de reperfusión sobre el músculo soleo, evidenció que la isquemia produce edema de las fibras musculares, la aparición de contornos angulares y en la mayoría de las fibras, disminución de sus diámetro (Carmo-Araújo, 2007). Luego de 4 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión se observó edema del músculo, fibras musculares en hipercontractura con desarreglo miofibrilar, lesión mitocondrial y dilatación del retículo sarcoplásmico (Carmo-Araújo, 2007). En el mismo estudio, luego de 24 horas de reperfusión se observó infiltrado inflamatorio intenso en el endomisio y el perimisio. Luego de 72 horas de reperfusión se observaron áreas con infiltrado inflamatorio y fibras musculares en diferentes estados de necrosis y fagocitosis como se observa en la figura 1 (Carmo-Araújo, 2007). El estudio concluye que los estados de reperfusión inducen daño histológico progresivo (Carmo-Araújo, 2007).

Otros estudios (Blaisdell, 2002) sugieren que no sólo la reperfusión produce daño muscular sino también el grado de isquemia a que es sometido el músculo. Se ha observado daño irreversible de las fibras musculares, el cual se inicia después de tres horas de isquemia y puede llegar a lesión completa a las seis horas (Blaisdell, 2002). Estos datos sugieren entonces que la lesión muscular es directamente proporcional a la severidad de la isquemia, al tiempo que dura la isquemia y al tiempo que ha durado la reperfusión al momento del estudio (Blaisdell, 2002). Si bien estos estudios son muy informativos acerca del daño muscular secundario a isquemia-reperfusión, la mayoría de ellos se

ha hecho a tiempos muy prolongados y no se han hecho tratando de establecer una correlación con la función muscular.

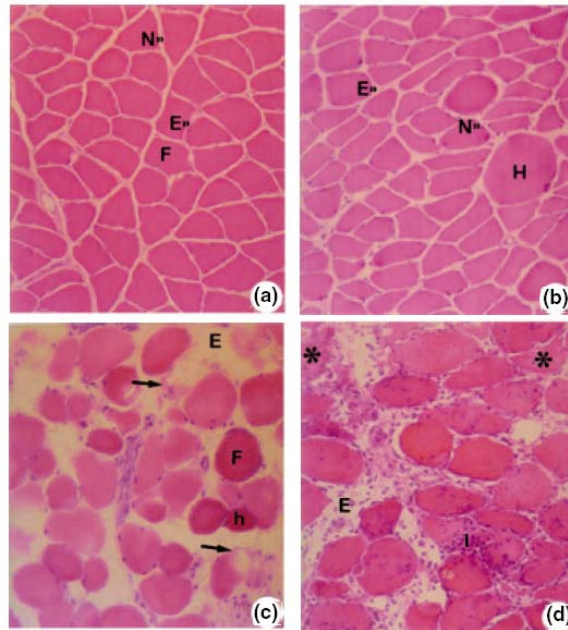


Figura 1. Histología del músculo soleo con hematoxilina eosina (x40). a) músculo soleo sin isquemia, núcleos periféricos (n), fibra muscular normal (f), endomisio (e). b) músculo soleo post 4 horas de isquemia, aparición de células hipertróficas (H). c) m. soleo post 4 horas de isquemia y 1 horas de perfusión, aparición de fibras en hipercontractura (h), fibras con desorganización miofibrilar (flechas) y edema (E). d) músculo soleo post 4 horas de isquemia 24 horas de perfusión, edema (E), infiltrado inflamatorio intenso (I), fibras necróticas. Tomado de Carmo-Araújo *et al.*, 2007.

3.10. Respuesta funcional del músculo esquelético a la isquemia y a la isquemia-reperfusión.

Los ensayos de la respuesta funcional del músculo esquelético a procesos de isquemia y de isquemia-reperfusión se han basado en el estudio de la sacudida simple y en el estudio de la tensión tetánica, en músculos que presentan diferente composición de fibras musculares. Se ha observado que la sacudida simple del músculo soleo (mayor predominio de fibras tipo I) presenta una caída de la tensión un 30% mayor en los primeros 15 minutos de isquemia cuando se compara con en el músculo extensor largo de los dedos (mayor predominio de fibras tipo II) (Carvalho, McKee & Green, 1996). La diferencia observada en la caída de la tensión se mantiene durante los primeros 30 y 45 minutos de la isquemia, pero al final de los 60 minutos de isquemia, la diferencia ya no es significativa entre los dos tipos de músculo como se muestra en la figura 2. Luego de 90 minutos en presencia de isquemia, los niveles de tensión de las sacudidas simples para ambos grupos musculares llegan a valores del 10% de la tensión inicial (Carvalho, McKee & Green, 1996). A partir de allí no se observa una disminución significativa de la tensión de las sacudidas simples entre los 90 y 180 minutos (figura 2). En general, se observa que en ambos tipos de músculos, la fuerza muscular en sacudidas simples después de 30 minutos decae en un 70% de la fuerza inicial y 90 minutos

después de la isquemia llega a valores del 10% de la fuerza inicial (Carvalho, McKee & Green, 1996).

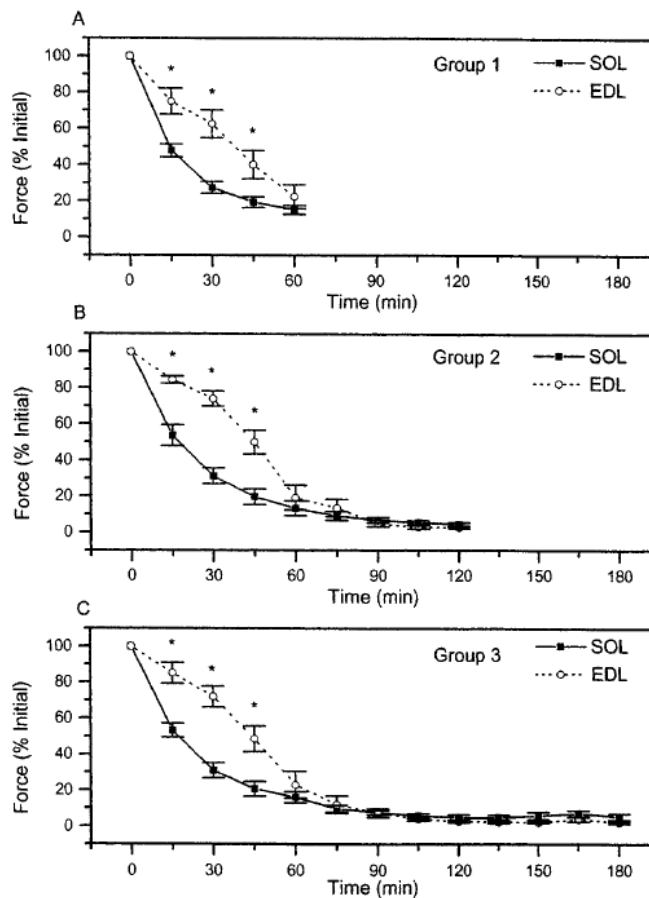


Figura 2. Cambios observados a 1, 2 y 3 horas, en presencia de isquemia, en la tensión máxima en la sacudida simple normalizada por la tensión medida a tiempo 0. Extensor digital largo (EDL) con mayor predominio de fibras musculares tipo II y músculo soleo (SOL) con mayor predominio de fibras tipo I. Tomado de Carvalho, McKee & Green, 1996.

En experimentos donde se induce isquemia por una hora, seguida por dos horas de perfusión, se ha comprobado que ambos tipos de músculos presentan una recuperación de los parámetros funcionales y metabólicos (Carvalho, McKee & Green, 1996). En estos estudios de isquemia-reperfusión se determinó que la recuperación del músculo soleo (oxidativo) en los primeros 15 minutos de perfusión -luego de una hora de isquemia- es mayor que la del músculo extensor digital largo (glucolítico) (figura 3) (Carvalho, McKee & Green, 1997). A partir de ese tiempo la recuperación es similar para ambos tipos de músculos (Carvalho, McKee & Green, 1997). Lo observado en estos estudios indica que las principales diferencias funcionales entre los dos tipos de músculos, cuando su funcionalidad se evalúa a través del comportamiento de su sacudida simple, se presentan al comienzo de los procesos isquémicos y al inicio de los procesos de perfusión (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997). Por otro lado, se observó que luego de dos horas de perfusión, la fuerza muscular se recupera solamente a un 30-40% de la fuerza a tiempo cero después de dos horas de isquemia y tan solo a un

10-20% de la fuerza a tiempo cero después de tres horas de ischemia (figura 3) (Carvalho, McKee & Green, 1997). También se observa consistentemente que no hay diferencias significativas en la recuperación de la fuerza entre una hora y dos horas de reperfusion (Carvalho, McKee & Green, 1997). Sin embargo, en procesos de dos y tres horas de ischemia seguidos por dos horas de reperfusion, los parámetros funcionales y metabólicos permanecen disminuidos entre un 50% y un 40% de la capacidad muscular (Carvalho, McKee & Green, 1997).

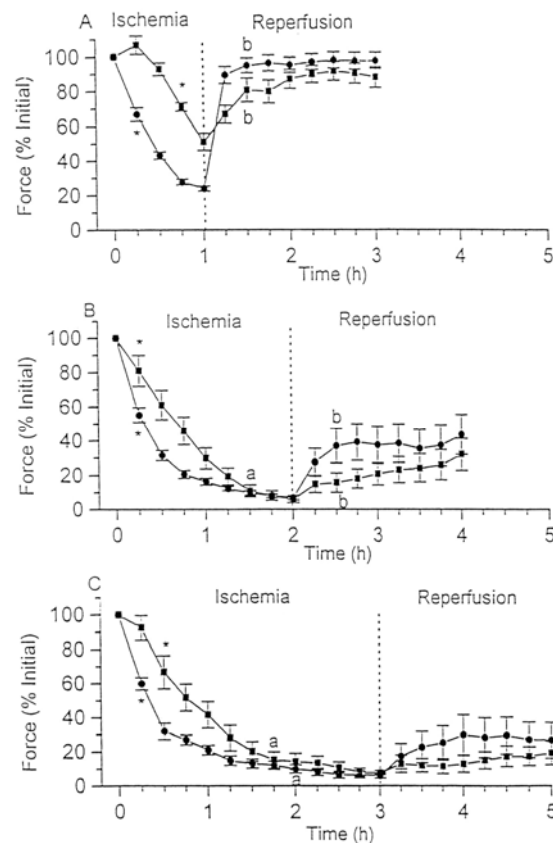


Figura 3. Cambios en la tensión máxima en la sacudida simple normalizada por la tensión a tiempo 0. Extensor digital largo (cuadrados) con mayor predominio de fibras musculares tipo II y músculo soleo (círculos) con mayor predominio de fibras tipo I. (A) una hora de ischemia y dos horas de reperfusion; (B) dos horas de ischemia y dos horas de reperfusion; (C) tres horas de ischemia y dos horas de reperfusion. Tomado de (Carvalho, McKee & Green, 1997).

En otro estudio realizado en ratones (Woitaske & McCarter, 1998), se evaluó el efecto del tiempo de reperfusion luego de tres horas de ischemia, comparando el músculo soleo (oxidativo) y el músculo extensor digital largo (glucolítico). Se encontró que la tensión activa en la sacudida simple de ambos músculos se recupera aproximadamente en un 10% a los tres días de luego de iniciada la reperfusion, en un 50% para el músculo soleo y en un 30% para el músculo extensor largo de los dedos después de 7 días de reperfusion, y en un 70% para ambos músculos después de 14 días de reperfusion (Woitaske & McCarter, 1998) (figura 4). Otro estudio realizado en ratas Wistar (Fish *et al.*, 1989) donde se evaluó el efecto de 1, 2, 3 y 4 horas de ischemia muscular, seguidas de reperfusion por dos semanas, se encontró igualmente que hay una

correlación negativa entre el tiempo de isquemia y la función muscular evaluada por la sacudida simple (tensión máxima y tiempo de contracción) y por la contracción tetánica (tensión máxima) (Fish *et al.*, 1989). Se corroboró además que la función muscular después de tres horas de isquemia no se vuelve a recuperar completamente luego de 14 días de perfusión.

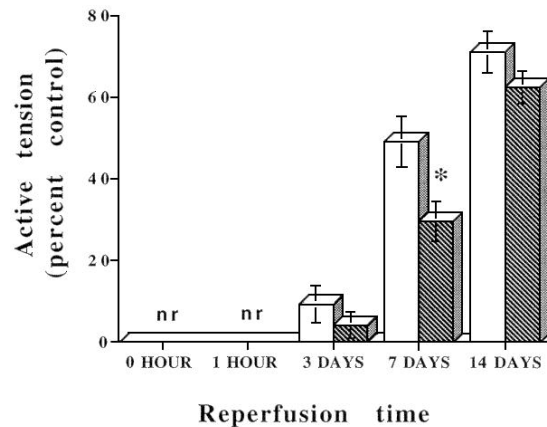


Figura 4. Cambio en la tensión activa en sacudida simple. En el músculo soleo (barras blancas) y extensor digital largo (barras oscuras) expresado en porcentaje de los músculos control a 0 horas, 1 hora, 3 días, 7 días y 14 días de perfusión. Tomado de Woitaske & McCarter, 1998.

3.11. Respuesta metabólica del músculo esquelético a la isquemia y a la isquemia-reperfusión.

Se ha descrito que la isquemia induce en el músculo esquelético condiciones de hipoxia, hipercapnia, y la retención a nivel extracelular de metabolitos como ATP, adenosina, protones, lactato, hipoxantina y colina, entre otros (Korth *et al.*, 2000; Mense, 2009). La isquemia se puede acompañar de dolor que se presenta generalmente por la acumulación de estos metabolitos (Mense, 2009). Estudios realizados en humanos sugieren que los procesos isquemia muscular son dolorosos en parte debido a la acumulación de protones y de ATP en el espacio extracelular (Forrester, 1972). Sin embargo, los estudios indican que en el músculo esquelético los efectos de la isquemia-reperfusión son altamente dependientes del nivel de actividad o estimulación a que es sometido el músculo durante el protocolo de isquemia-reperfusión utilizado en cada caso (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Gürke, *et al.*, 2000).

En un modelo de 3 horas de isquemia, seguido de 1,5 horas de perfusión, sin estimulación y aplicando un torniquete al miembro anterior de conejos anestesiados, se reporta un incremento de cuatro veces en la concentración de lactato durante el periodo isquémico, el cual retornó a valores normales luego de la perfusión (Jennische, Hagberg & Haljamäe, 1982). En el mismo estudio se encontró un cambio en la concentración de K^+ extracelular entre 4 y 16 mM y una despolarización del potencial de membrana de reposo entre -90 mV y -60 mV, durante el periodo de 3 horas de isquemia (Jennische, Hagberg & Haljamäe, 1982). Luego de la liberación del torniquete se observó una

recuperación bifásica de ambos parámetros, muy rápida en los primeros 15 minutos y más lenta en los siguientes 75 minutos, cuando ambos parámetros regresaron a sus valores normales (Jennische, Hagberg & Haljamäe, 1982). En este estudio la caída del potencial de membrana parece ir paralela al aumento en la concentración de K^+ extracelular, así durante la primera hora de isquemia el K^+ extracelular aparenta haber aumentado a 8 mM, mientras el potencial de membrana cae a valores alrededor de -70 mV (Jennische, Hagberg & Haljamäe, 1982). Los autores reportan que el ATP se mantuvo constante durante las 4,5 horas de cada experimento. El pH intracelular no se midió, pero considerando el incremento en el lactato, concluyen que los cambios observados se deben a una inhibición de la bomba de Na^+/K^+ o a un cambio en la permeabilidad del sarcolema al K^+ , inducidos por una disminución del pH intracelular (Jennische, Hagberg & Haljamäe, 1982). Se sabe sin embargo que en acidosis leve como la reportada, la bomba Na^+/K^+ incrementa su actividad, antes que disminuirla (Clausen, 2009), lo cual sugiere que los cambios observados se pueden deber a un cambio en la permeabilidad al K^+ .

En un estudio posterior con el mismo modelo con el músculo gastrocnemio, también sin estimulación (Hagberg, 1985), se observa una caída más lenta en el potencial de membrana a -80 mV en la primera hora de isquemia, -70 mV en la segunda y -60 mV en la tercera hora (Hagberg, 1985). El pH intracelular cayó desde 7,0 a 6,93 en la primera hora de isquemia, 6,86 en la segunda hora y 6,73 en la tercera hora (Hagberg, 1985). El pH extracelular cayó desde 7,3 hasta 6,93 en la primera hora de isquemia, 6,7 en la segunda hora y 6,5 a las tres horas (Hagberg, 1985). El ácido láctico aumenta de 5 mM al comienzo hasta 30 mM a la cuarta hora de isquemia (Hagberg, 1985). El ATP prácticamente no cambia durante las 4 horas de isquemia, mientras que el contenido de glucógeno cayó en un 40% (Hagberg, 1985).

Otro estudio, adelantado con la aplicación de un torniquete en el miembro posterior de ratas, sin estimulación, se reporta que luego de dos horas de isquemia se observa en el músculo soleo (oxidativo) y en el músculo tibial (gluocítico) una caída del 90% en los niveles de PCr (Idström *et al.*, 1990). En el mismo tiempo se observa que el ATP cae en un 35% en el músculo soleo y un 64% en el músculo tibial (Idström *et al.*, 1990). La concentración de ADP durante las dos horas de isquemia no cambia en el músculo tibial, mientras que en el soleo se observa un incremento del 50% (Idström *et al.*, 1990). El AMP aumento 3 veces en el músculo soleo, mientras que el cambio en músculo tibial no fue significativo (Idström *et al.*, 1990). Durante el mismo tiempo, la cantidad total de nucleótidos cíclicos disminuye un 50% en el tibial, mientras que en el músculo soleo no se observa un cambio significativo (Idström *et al.*, 1990). La concentración de inosina 5'-monofosfato (IMP) aumenta 16 veces en el músculo tibial, mientras que en soleo aumenta 5 veces (Idström *et al.*, 1990). De otro lado la concentración de adenosina se mantiene inalterada en el soleo y en el músculo tibial. La inosina, por el contrario aumenta 17 veces en el músculo soleo y 36 veces en el músculo tibial (Idström *et al.*, 1990). El complejo hipoxantina-xantina aumenta 5 veces su concentración en el músculo soleo y 4 veces en el músculo tibial (Idström *et al.*, 1990). Finalmente, el ácido úrico

permanece constante en ambos tipos musculares luego de las dos horas de isquemia (Idström *et al.*, 1990).

Cuando estos metabolitos vuelven a medirse luego de una hora de reperusión (dos horas previas de isquemia), se encuentra que en el músculo soleo la PCr, el ATP, el ADP, el AMP, la IMP, todos se recuperaron a sus valores normales medidos antes de la isquemia, en tanto que la inosina siguió aumentando hasta llegar a valores 22 veces más altos que en las condiciones control, mientras que el complejo hipoxantina-xantina se recuperó, pero mantuvo concentraciones del doble con respecto a los valores medidos antes de la isquemia (Idström *et al.*, 1990). De otra parte, durante la reperusión en el músculo tibial, se observó una recuperación a los valores normales únicamente en la cantidad de adenosina (Idström *et al.*, 1990). La PCr y el ATP, si bien se recuperaron, lo hicieron sólo a un 50% del valor normal medido antes de la isquemia (Idström *et al.*, 1990). El número total de nucleótidos cíclicos no se recupera en el músculo tibial (Idström *et al.*, 1990). La cantidad de IMP en el músculo tibial, si bien se recupera aun permanece 7 veces por encima de los valores medidos antes de la isquemia, en tanto que la inosina siguió aumentando hasta llegar a valores 45 veces más altos que en las condiciones control (Idström *et al.*, 1990). Así mismo, el complejo hipoxantina-xantina no se recuperó en el músculo tibial y mantuvo los valores alcanzados durante la isquemia (Idström *et al.*, 1990). Finalmente, en el músculo tibial se observa un incremento del 50% en la cantidad de ácido úrico (Idström *et al.*, 1990).

En 1996, con la aplicación de un torniquete en el miembro posterior de ratas, aplicando cada 15 minutos un pulso de 70 V con 0,2 ms de duración, manteniendo la temperatura del músculo en 32° C y aplicando un tren de pulsos por 500 ms a 250 Hz al finalizar de cada hora de isquemia, se investigaron la fuerza máxima en la sacudida simple y la fuerza tetánica máxima y los efectos metabólicos de 1, 2 y 3 horas de isquemia en el músculo soleo (SOL) y en el músculo extensor largo de los dedos (EDL) (Carvalho, McKee & Green, 1996). Las mediciones indican que en el EDL, el ATP disminuyó un 23% luego de 1 hora, un 66% luego de 2 horas y un 95% luego de 3 horas de isquemia. En el SOL, el ATP disminuyó a 31% luego de 1 hora, un 79% luego de 2 horas y un 95% luego de 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996). De otro lado, en el EDL, el ADP aumentó en un 60% (16 microM) luego de 1 hora, regreso a su valor normal (10 microM) luego de 2 horas y finalmente disminuyó a 68% (6,8 microM) luego de 3 horas de isquemia. En el SOL, el ADP aumentó en un 40% (17 microM) luego de 1 hora, luego disminuyó a 80% (9,6 microM) luego de 2 horas y finalmente disminuyó a 62% (7,5 microM) luego de 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996).

En este estudio, el AMP en el EDL aumentó 2 veces su concentración luego de 1 hora, bajo a 1,5 veces su concentración normal luego de 2 horas y disminuyó a 85% luego de 3 horas de isquemia. El AMP en el SOL aumentó 2 veces su concentración luego de 1 hora, bajo a 1,2 veces su concentración normal luego de 2 horas y disminuyó a 50% luego de 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee

& Green, 1996). En el EDL los nucleótidos totales cayeron a un 24% en la primera hora, a un 56% en la segunda hora y a un 86% en la tercera hora de isquemia. En el SOL los nucleótidos totales cayeron a un 15% en la primera hora, a un 66% en la segunda hora y a 84% en la tercera hora de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996). En el EDL, la IMP aumentó su concentración 8 veces en la primera hora, 16 veces en la segunda hora y se mantuvo en estos niveles durante la tercera hora de isquemia. La IMP en el SOL aumentó su concentración 7,5 veces en la primera hora, 17,5 veces en la segunda hora y 28 veces durante la tercera hora de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996). De otro lado, la inosina en el EDL aumentó 4 veces en la primera hora, 7,4 veces en la segunda hora y 15 veces en la tercera hora de isquemia. En el SOL, la inosina aumentó 2,7 veces en la primera hora, 6,6 veces en la segunda hora y 12 veces en la tercera hora de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996). En cuanto a la hipoxantina en el EDL, se encontró un incremento de 3,3 veces en la primera hora, 6 veces en la segunda hora y de 10 veces en la tercera hora de isquemia. En el SOL, se encontró un incremento de 3,3 veces en la primera hora, 6 veces en la segunda hora y de 10 veces en la tercera hora de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996).

En este mismo estudio, se observó en el EDL que la PCr disminuyó un 75% (5,3 mM) luego de 1 hora, se mantuvo en esos niveles (5,3 mM) luego de 2 horas y un 93% (1,6 mM) luego de 3 horas de isquemia. En el SOL, la PCr disminuyó un 87% (2,1 mM) luego de 1 hora, un 89% (1,8 mM) luego de 2 horas y un 88% (2 mM) luego de 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996). La creatina en el EDL aumentó un 82% (14,6 mM) luego de 1 hora, cayó y se mantuvo aumentada en un 50% (12 mM) luego de 2 horas y volvió a aumentar en un 89% (15 mM) luego de 3 horas de isquemia. En el SOL, la creatina aumentó un 73% (10 mM) luego de 1 hora, cayó y se mantuvo aumentada en un 46% (8,7 mM) luego de 2 horas y volvió a aumentar en un 81% (11 mM) luego de 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996). El fosfato inorgánico en el EDL aumentó un 75% (7 mM) luego de 1 hora, se mantuvo en un 75% (7 mM) luego de 2 horas y volvió a aumentar a un 147% (10 mM) luego de 3 horas de isquemia. En el SOL, el fosfato inorgánico aumentó un 89% (5,7 mM) luego de 1 hora, aumento en un 98% (5,9 mM) luego de 2 horas y volvió a aumentar en un 161% (7,8 mM) luego de 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996). La creatina total se mantuvo estable luego de 1 hora, 2 horas y 3 horas de isquemia en el EDL (31 mM) y en el SOL (22 mM) (Carvalho, McKee & Green, 1996).

El glucógeno en el EDL cayó a un 34% en la primera hora, se mantuvo igual durante la segunda hora y en la tercera hora cayó a un 15%. En el SOL, el glucógeno cayó a un 37% en la primera hora, en la segunda hora cayó a un 26% y en la tercera hora cayó a un 9% (Carvalho, McKee & Green, 1996). La glucosa en general no mostró cambios significativos durante las tres horas en los dos grupos musculares (Carvalho, McKee & Green, 1996). La medición de otros metabolitos intermediarios muestra un aumento del 100% y 50% en la glucosa-1P en las primeras dos horas de isquemia en ambos músculos (Carvalho, McKee & Green, 1996). Este incremento se ve acompañado por el

aumento de metabolitos intermediarios de la glicolisis tales como la glucosa-6P, la fructosa-6P y la fructosa-1,6P (Carvalho, McKee & Green, 1996). Estos incrementos sugieren que en ambos músculos, al menos en la primera hora de isquemia la glicolisis está muy activa, posiblemente ayudando a mantener las concentraciones normales de ATP intracelular (Carvalho, McKee & Green, 1996). Finalmente, en el estudio se midieron los niveles de lactato intracelular. En la primera hora se observa el mayor incremento, siendo de 5 veces la concentración normal en el EDL y 7 veces en el SOL (Carvalho, McKee & Green, 1996). En la segunda hora las concentraciones se mantienen elevadas pero estables y en la tercera hora el lactato aumenta hasta 7 veces su concentración normal en el EDL. En el soleo la concentración de lactato aumenta 10 veces en la segunda hora y se mantiene así hasta la tercera hora (Carvalho, McKee & Green, 1996). Con estas concentraciones de lactato, se calculó una caída del pH intracelular en el EDL durante la primera hora de 0,26 (6,82 a 6,56), de 0,48 (6,8 a 6,32) durante la segunda hora y de 0,61 (6,81 a 6,2) durante la tercera hora de isquemia. Los cálculos para el SOL indican un cambio de pH intracelular de 0,34 (7,01 a 6,67), de 0,57 (7,01 a 6,44) durante la segunda hora y de 0,63 (7,01 a 6,38) durante la tercera hora de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996). Aunque los cambios son mayores en el SOL, el pH final siempre es más ácido en el EDL casi por 0,1 unidades de pH.

Este mismo grupo realizó en 1997 un nuevo estudio con los mismos músculos, observado ahora los efectos funcionales y metabólicos de admitir 2 horas de perfusión luego de 1, 2 y 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1997). Estas mediciones indican que en el EDL, la concentración de ATP se recupera totalmente a valores normales (5,5 hasta 7 mM) luego de 2 horas de perfusión precedidas de 1 hora de isquemia, en tanto que la concentración se recuperó a un 60% del valor normal (2,3 hasta 4,2 mM) cuando precedieron 2 horas de isquemia y a un 48% del valor normal (0,35 hasta 3,4 mM) cuando precedieron 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1997). En el SOL el ATP se recuperó a su valor normal (3,8 hasta 5.5 mM) cuando precedió una hora de isquemia, a un 68% del valor normal (1,2 hasta 3,7 mM) cuando precedieron 2 horas de isquemia y a un 49% del valor normal (0,28 hasta 2,7 mM) cuando precedieron 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1997). En el EDL la concentración de ADP se recupera totalmente a valores normales (16 hasta 10 microM) luego de 2 horas de perfusión precedidas de 1 y 2 horas de isquemia, en tanto que la concentración se recuperó a un 75% del valor normal (6,8 hasta 7,5 microM) cuando precedieron 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1997). En el SOL el ADP disminuyó a un 83% de su valor normal (17 hasta 8,3 microM) cuando precedió una hora de isquemia, subió a un 85% del valor normal (9,5 hasta 8,5 microM) cuando precedieron 2 horas de isquemia y cayó nuevamente a un 64% del valor normal (7,5 hasta 6,4 microM) cuando precedieron 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1997).

En el EDL el AMP que había aumentado 2 veces su concentración luego de 1 hora de isquemia, disminuyó a 0,7 veces su concentración luego de dos horas de perfusión, se niveló a su concentración normal cuando precedieron 2

horas de isquemia y cayó a 0,75 veces su concentración normal cuando precedieron 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1997). En el SOL el AMP cayó de 2 veces a 0,88 su concentración normal cuando precedió 1 hora de isquemia, bajó aun más desde 1,2 veces a 0,52 veces su concentración normal cuando precedieron 2 horas de isquemia y subió ligeramente a 0,56 (desde 0,5) su concentración normal cuando precedieron 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1997). La reperfusión produjo en ambos músculos un incremento en los niveles de IMP e inosina, en los grupos que fueron anteceditos por 2 y 3 horas isquemia, en el otro grupo los niveles se mantuvieron cerca de lo normal. La hipoxantina fue prácticamente no detectable durante la reperfusión, con excepción de la muestra del SOL procesada luego de 3 horas de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1997).

La PCr recuperó en ambos músculos sus valores normales durante la reperfusión cuando fue precedida por 1 hora de isquemia. Cuando la isquemia fue de 2 horas, luego de la reperfusión la PCr en el EDL se mantuvo en el 50% de su valor normal y mientras que en el SOL se recupero a su valor normal. En el grupo de tres horas de isquemia, el EDL recupero su PCr a un 40% del valor normal, mientras que el SOL lo hizo en un 80% (Carvalho, McKee & Green, 1997). Los niveles de creatina se recuperaron totalmente en los tres grupos experimentales en ambos músculos (Carvalho, McKee & Green, 1997). Los niveles de fosfato inorgánico se recuperaron a sus valores normales en ambos grupos musculares en el grupo que sufrió una hora de isquemia. En el grupo que fue sometido a 2 horas de isquemia, el fosfato inorgánico permaneció elevado en un 53% (6,1 mM) en el EDL y en un 23% (3,7 mM) en el SOL. En el grupo que fue sometido a 3 horas de isquemia, el fosfato inorgánico permaneció elevado en un 62% (6,5 mM) en el EDL y en un 23% (3,7 mM) en el SOL (Carvalho, McKee & Green, 1997). La concentración de lactato en el EDL disminuyó a un 0,7 de su concentración normal luego de 2 horas de reperfusión, precedida por 1 hora de isquemia. En el mismo tiempo, en el SOL se mantuvo elevada en un 1,5 de su valor normal (Carvalho, McKee & Green, 1997). Cuando la reperfusión fue precedida por 2 horas de isquemia el lactato en el EDL se mantuvo 5 veces por encima de su concentración normal, mientras que en el SOL 2 veces por encima (Carvalho, McKee & Green, 1997). En el protocolo con 3 horas de isquemia el lactato en el EDL se mantuvo 4 veces por encima de su concentración normal, mientras que en el SOL 2 veces por encima (Carvalho, McKee & Green, 1997). La concentración de glicógeno se recuperó a sus valores normales en el EDL y el SOL independientemente del tiempo de isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1997). Estas mediciones sugieren que el pH se recupera más rápido y establemente en SOL que en el EDL. Los autores resaltan haber encontrado una fuerte correlación positiva entre los niveles de ATP y la fuerza medida, y una correlación negativa entre los niveles de lactato y la fuerza registrada.

3.12. Homeostasis de Ca^{2+} del músculo esquelético durante la isquemia-reperfusión.

La homeostasis de Ca^{2+} durante isquemia ha sido menos estudiada en el músculo esquelético que en el músculo cardíaco. En el músculo espinotrapezio de ratas se midieron los niveles intracelulares de Ca^{2+} durante isquemia y reperfusión (Ivanics *et al.*, 2000). Los resultados indican que periodos de isquemia cortos (5, 15 y 30 minutos) seguidos de 1 hora de reperfusión no promueven cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Ivanics *et al.*, 2000). Luego de 1 y 2 horas de isquemia se observaron cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} , pero los resultados fueron variables. Green y otros (1996) estudiaron la actividad de la bomba tipo SERCA aislada de microsomas del EDL y el SOL, luego de que estos músculos fueron sometidos a 1, 2 y 3 horas de isquemia. En este estudio se encontró que la actividad de la SERCA en el EDL es 42% más alta que en los controles luego de 1 hora de isquemia, 66% más alta que en los controles luego de 2 horas de isquemia y 71% más alta que en los controles luego de 3 horas de isquemia (Green *et al.*, 1996). En el SOL, la actividad de la SERCA luego de 1 hora de isquemia fue la misma que en los controles, 37% más alta que en los controles luego de 2 horas de isquemia y 60% más alta que en los controles luego de 3 horas de isquemia (Green *et al.*, 1996). En un estudio posterior (Green *et al.*, 1997), el mismo grupo reporta que al someter el EDL y el SOL a 1, 2 y 3 horas de isquemia, seguidas de 2 horas de reperfusión, la actividad de la SERCA en el EDL disminuyó en un 12% con respecto al aumento observado durante 1 hora de isquemia, 17% con respecto al aumento observado durante 2 horas de isquemia y 34% con respecto al aumento observado durante 3 horas de isquemia (Green *et al.*, 1997). En el SOL, la actividad de la SERCA disminuyó 24% con respecto al aumento observado durante 1 hora de isquemia y la actividad se mantuvo sin cambios frente a los grupos de 2 y 3 horas de isquemia (Green *et al.*, 1997). Los autores proponen que en esta reducción hay dos componentes, uno que retorna la SERCA a su actividad normal luego del incremento ocurrido durante la isquemia y otro que durante la reperfusión deprime su actividad normal más allá de esta recuperación (Green *et al.*, 1997).

Procesos como la liberación de Ca^{2+} desde el RS o la entrada de Ca^{2+} durante la isquemia también han sido poco estudiados. Se ha determinado que la tasa de liberación de Ca^{2+} se disminuye durante la fatiga muscular, pero no hay datos durante de la isquemia (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Con respecto a la entrada de Ca^{2+} , en un estudio adelantado con el músculo EDL aislado se determinó que la anoxia induce un aumento de Ca^{2+} y una pérdida de la integridad de la membrana celular del músculo (Fredsted *et al.*, 2005). El EDL aislado fue incubado en 1,3 mM de Ca^{2+} externo (incluyendo $^{45}\text{Ca}^{2+}$) durante más de 120 minutos y la captura del Ca^{2+} radiactivo se comparó en condiciones de 95% O_2 y de anoxia total (Fredsted *et al.*, 2005). Se observó que en condiciones de anoxia el EDL acumuló un 50% más de Ca^{2+} a los 10 minutos de incubación, 70% más a los 30 minutos, 100% más a los 40 minutos, 114% más a los 90 minutos y 140% a los 120 minutos (Fredsted *et al.*, 2005). La

curva muestra que el Ca^{2+} se acumula más rápidamente en los primeros 40 minutos y luego la tasa de acumulación se hace más lenta.

4. MATERIALES Y METODOLOGIA.

4.1. Animales para experimentación.

Se adelantó un estudio de investigación basado en experimentación con animales. Se emplearon 90 ratas adultas machos Wistar con pesos entre 300 a 400g. Los biomodelos se alojaron en grupos de cuatro ratas en cada jaula plástica en el bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. El bioterio mantiene una temperatura promedio entre 20°C y 24°C y mantiene condiciones de humedad del 55%. Todos los animales fueron manejados de acuerdo a las normas éticas nacionales e internacionales recogidas en el manual del bioterio de la Facultad de Salud. Todos los protocolos experimentales propuestos fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universidad del Valle. Los procedimientos que se emplearon durante el presente estudio no causaron sufrimiento a los animales de experimentación, ya que durante las etapas experimentales estuvieron bajo sedación. Durante su permanencia en el bioterio, el bienestar de los animales fue continuamente supervisado por nosotros con la ayuda de un veterinario. Todos los procedimientos se hicieron respetando las normas de asepsia y antisepsia necesarias. Si durante los procedimientos descritos abajo, se observó perturbación o sufrimiento en los animales, se les practicó inmediatamente la eutanasia de la forma en que se describe y esos animales no fueron usados para experimentación.

El tamaño de la muestra experimental total se calculó con base en el número de 6 grupos experimentales y 6 grupos control que se ensayaron durante la investigación. Considerando que previamente no conocíamos la desviación típica de las medias que arrojarían los parámetros a medir y analizar, presumimos una distribución normal, considerando que en los estudios previos se utilizó la t de Student para verificar la significancia estadística entre las diferencias observadas entre las poblaciones de datos obtenidos (Fish *et al.*, 1989; Carvalho *et al.*, 1996; McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998) En estos trabajos se utilizaron en promedio 5 animales por grupo de experimentación. Considerando que la varianza fue grande en algunos de estos estudios, en este trabajo aumentamos la muestra a 9 animales por grupo experimental. De otra parte, consideramos probable que si los grupos control se mantenían estables durante el tiempo experimental como se afirma en estudios previos, ellos mostrarían una posible menor varianza en las medias, por lo cual era posible restringir esta muestra a 6 animales por grupo.

4.2. Procedimientos generales.

Para todos los procedimientos los animales fueron pesados y luego llevados a sedación profunda. Primero se hizo inducción de la sedación profunda

colocándolos en una cámara cerrada, la cual se gasificó con Isoflurano al 100% (ISOFLUORANO USP® - Baxter) durante 2 minutos hasta lograr la sedación profunda del animal. Luego, la sedación profunda se mantuvo mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Pental® - INVET) (6 mg / 100 g de peso corporal), seguida de inyecciones de mantenimiento cada hora con pentobarbital sódico (2 mg / 100 g de peso corporal) (Carvalho, McKee & Green, 1996). El pentobarbital sódico induce sedación profunda, lo cual es importante para estos experimentos, ya que así evitamos interferir de manera importante con el sistema nervioso periférico y muscular durante los mismos. Una vez terminado cada experimento, los animales fueron sacrificados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Pental® - INVET) (18 mg / 100 g de peso corporal). Luego de aplicar esta dosis letal, los animales se mantuvieron bajo observación en el mismo montaje experimental durante 15 minutos, tiempo durante el cual se verificó el cese de la respiración, la ausencia de latidos cardiacos y la presencia de cornea opaca. En presencia de estos signos de muerte, el animal fue dispuesto en una bolsa plástica y llevado al congelador, para luego eliminar sus restos por la vía hospitalaria que se encarga del manejo final de estos restos. En caso de dudas con respecto a la muerte del animal se administró una dosis letal adicional antes de disponer sus restos hacia la ruta hospitalaria.

4.3. Músculos para experimentación y su estimulación.

Como músculo esquelético de fibras tipo I, se utilizó el músculo soleo (SOL), el cual se considera que contiene más de un 80% de fibras oxidativas y 20% de fibras glicolíticas (Soukup, Zacharová, Smerdu, 2002). Es un músculo del miembro posterior, el cual se origina en la parte superior de la fíbula y en la línea soleal de la tibia. Su inserción es en el hueso calcáneo, pasando a través de la porción medial del tendón calcáneo. Su acción principal es mediar la flexión plantar del pie. Está irrigado por las ramas surales de la arteria poplítea, las ramas musculares de la arteria peroneal y la arteria tibial posterior. Su innervación proviene del nervio tibial y por ramas de los nervios espinales S1 y S2 (Soukup, Zacharová, Smerdu, 2002). Como músculo esquelético de fibras tipo II, se utilizó el músculo extensor radial largo del carpo (ERLC), el cual se considera que contiene más de un 80% de fibras glicolíticas y 20% de fibras oxidativas (Rodrigues, Silva & Pai, 1994). Es un músculo del miembro anterior, el cual se origina en el risco lateral inferior supracondilar y en el septo lateral intermuscular del humero. Se inserta en la base del segundo metacarpiano. A nivel de la muñeca, funciona como extensor y abductor de la mano. A nivel del codo sirve para flexionar y hacer supinación leve del antebrazo. Está irrigado por la arteria recurrente radial y es innervado por el nervio radial, los nervios espinales C5 y C6, y las ramas profundas del nervio radial (Rodrigues, Silva & Pai, 1994).

Antes de iniciar las mediciones de sacudida simple para cada músculo se determinó su longitud óptima, aplicando estimulaciones tetánicas con 50 pulsos de 0,2 ms de duración, de 15 V de amplitud a una frecuencia de 25 Hz para el músculo SOL, y de 30 V de amplitud a una frecuencia de 80 Hz para el

músculo ERLC. Estos protocolos fueron adaptados de estudios previos (Carvalho *et al.* 1992; McKee, *et al.* 1996). Se usó un estimulador operado por un computador (Biopac STM200), conectado a electrodos de platino colocados directamente sobre el vientre muscular y en contacto con una solución salina que se gotea sobre el músculo. La longitud del músculo se cambió con un manipulador que controla la altura de un transductor de fuerza (Biopac SS12LA) al cual se conectó el músculo desinsertado. La longitud óptima del músculo fue la que produjo el tétanos de mayor tensión. Para inducir las sacudidas simples en cada músculo se utilizó un pulso de 0,2 ms de duración y de 15 V de amplitud para el músculo SOL y un pulso de 0,2 ms de duración y de 30 V de amplitud para el músculo ERLC, cada 10 minutos durante el tiempo experimental.

El voltaje de estimulación se determinó mediante curvas de calibración elaboradas para nuestro sistema experimental. Elaboramos curvas de voltaje de estimulación en función de la tensión máxima, donde se aplicaron 50 pulsos de 0,2 ms a una frecuencia de 10 Hz para el músculo SOL, a diferentes amplitudes de estimulación: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 V. Para el músculo ERLC se aplicaron 50 pulsos de 0,2 ms a una frecuencia de 100 Hz, a diferentes amplitudes de estimulación: 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 V. Estas curvas indicaron que en nuestro sistema con 15 V se alcanza el 97% de la fuerza máxima del músculo soleo y con 30 V se alcanza el 96% de la fuerza máxima del músculo ERLC. En cada caso se dieron 10 minutos de descanso entre cada ráfaga de pulsos para evitar la fatiga muscular.

4.4. Mediciones de la función muscular.

El procedimiento para la preparación de los músculos SOL y ERLC para las mediciones funcionales en vivo ha sido previamente descrito (Carvalho *et al.*; 1996, Carvalho *et al.*, 1997 & McKee, 1996). Brevemente, se afeitó el pelo de los miembros anteriores y posteriores derechos, se abrió la piel con bisturí y se diseccionó el tendón de inserción (distal) de ambos músculos, el cual se aisló, desinsertó (cortándolo) y ató con hilo quirúrgico. El tendón de origen (proximal) permaneció en su sitio sin ser alterado. Las ratas fueron colocadas en posición en decúbito prono y el tendón desinsertado se conectó a través del hilo quirúrgico a un transductor de fuerza (Biopac SS12LA), quedando el músculo en posición perpendicular al miembro anterior o posterior del cual fue desinsertado. Previo a la conexión del tendón al transductor de fuerza, se colocó un torniquete neumático, por encima de la articulación de la rodilla para el músculo soleo y por encima de la articulación del codo para el músculo ERLC (Tsai & Hou, 2006; Conrad & Albadawi, 2006). Cada torniquete fue construido con una estructura circular de acero inoxidable que sostiene en su parte central una manguera de caucho, la cual se dilata radial y centripetamente cuando se insufla aire al torniquete. Para lograr una isquemia absoluta, se insufló aire desde una perilla de tensiómetro hasta llegar a presiones de 390 ± 10 mmHg (Tsai & Hou, 2006). Esta presión se controló a través de un transductor de presión (Biopac TSD120) durante el tiempo que duró la isquemia-reperfusión. Ver figuras 5 y 6.

Para determinar las respuestas control y aquellas típicas secundarias a isquemia y reperfusión, la temperatura de los dos músculos experimentales se mantuvo en $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997), la cual se considera como la temperatura fisiológica de reposo del músculo esquelético. Para lograr este control de temperatura, los músculos en posición experimental, es decir unidos al transductor de presión, fueron totalmente rodeados cada uno con un anillo de vidrio de 0.5 cm de radio interno y 2 cm de longitud. La pared de estos anillos tiene una cámara de aire en su espesor, la cual fue inundada con agua a 32 ± 0.5 . Estas cámaras de refrigeración están conectadas a un baño de circulación de agua constante y monitorizada con un transductor de temperatura (Biopac TSD202A). Adicionalmente, sobre la parte externa de cada uno de los músculos se mantuvo un goteo peri-muscular de $60 \text{ gotas} \pm 8/\text{minuto}$, con una solución salina con las siguientes concentraciones (en mM): 135 NaCl; 5 KCl; 2 CaCl_2 ; 2 MgCl_2 , 5 D-glucosa, 10 Hepes, con osmolaridad de 300 mOsm/L y pH ajustado a 7.4 con NaOH (a 32°C).

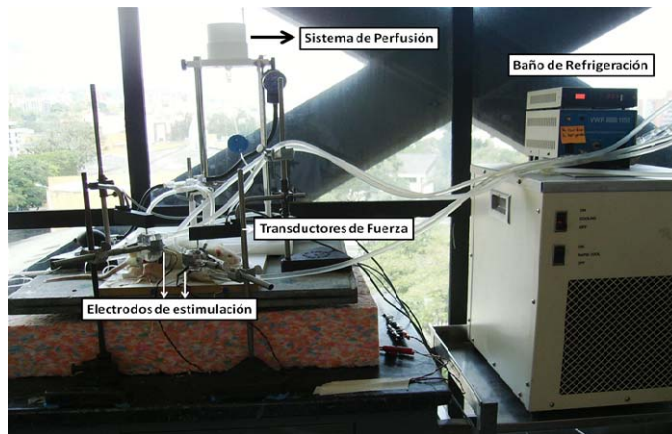


Figura 5. Montaje experimental, vista frontal.

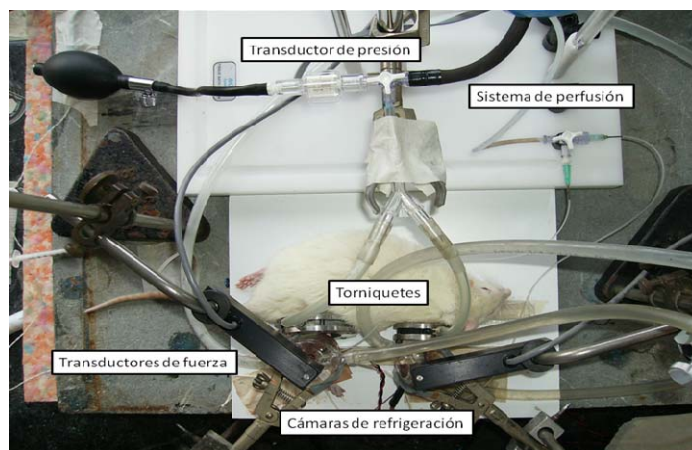


Figura 6. Montaje experimental, vista superior.

Este sistema experimental permitió hacer las mediciones de tensión en sacudida simple, monitorizar la temperatura en el ambiente cercano al músculo del cual se registró la tensión, registrar los eventos de estimulación del músculo

para correlacionarlos con los registro de fuerza muscular y registrar el valor de la presión aplicada al torniquete cuando se indujo la isquemia. El registro de las señales de estos cuatro transductores se envió por cuatro canales independientes a un amplificador MP35 de Biopac, de donde las señales fueron enviadas a un computador para su registro y posterior análisis utilizando los programas “Acqknowledge software” de la compañía Biopac y “MicroCal Origin 7.0” (Microcal Software Inc).

4.5. Parámetros funcionales medidos y analizados en la sacudida simple.

Para las sacudidas simples en condiciones isométricas que se registraron en cada uno de los músculos se midieron y analizaron los siguientes parámetros funcionales: (1) el tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$), (2) la fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}), (3) el tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$), (4) la tasa máxima de contracción ($(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$), (5) el tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$), (6) la tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) y (7) la integral fuerza(contracción-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$). Ver figuras 7, 8 y 9.

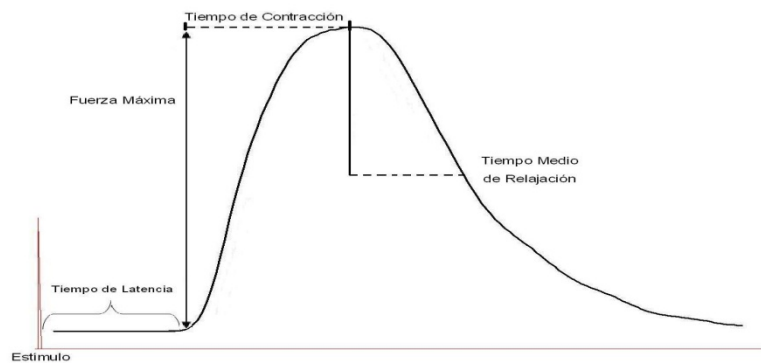


Figura 7. Contracción típica en sacudida simple del músculo soleo. Se detallan las mediciones del tiempo de latencia, la fuerza máxima de la sacudida, el tiempo de contracción y el tiempo medio de relajación.

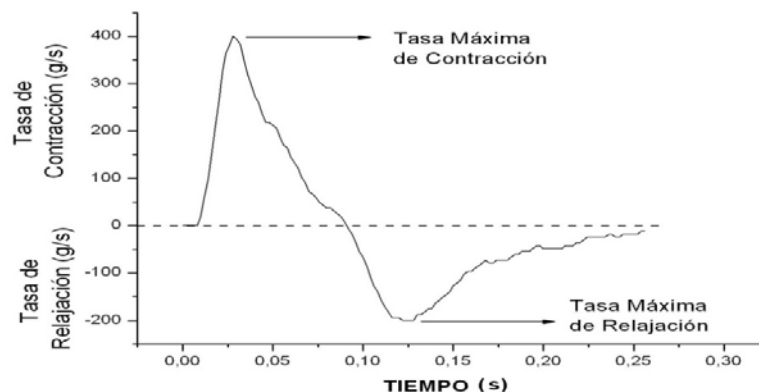


Figura 8. Derivada en función del tiempo de la contracción típica en sacudida simple del músculo soleo. Se detallan la tasa máxima de contracción y la tasa máxima de relajación.

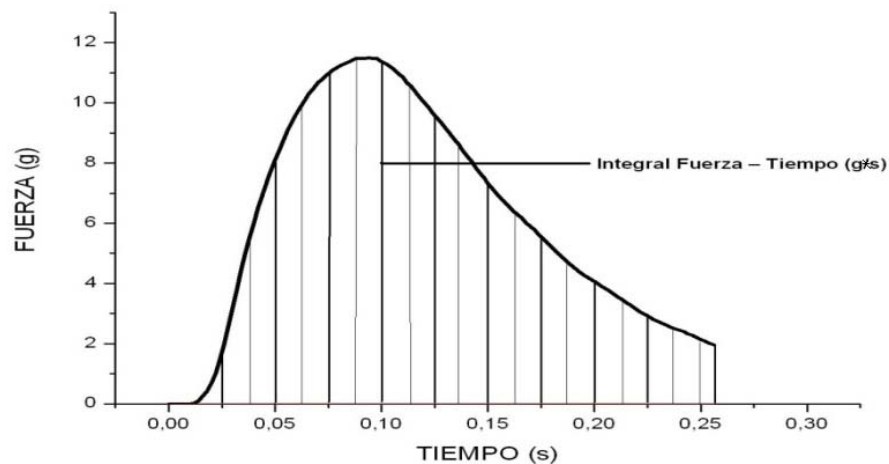


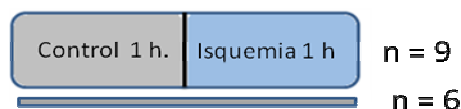
Figura 9. Contracción típica en sacudida simple del músculo soleo. Se detalla el cálculo de la integral fuerza-tiempo, el cual corresponde al área bajo la curva.

4.6. Diseño experimental.

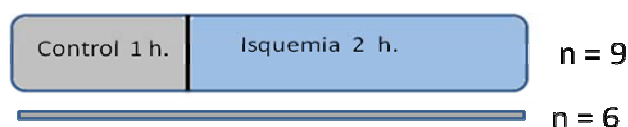
4.6.1. Caracterización de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo SOL y en el músculo ERLC durante 1, 2, y 3 horas de isquemia.

Se hicieron registros de 3 grupos experimentales de isquemia a 1, 2 y 3 horas ($n = 9$, para cada tiempo) y 3 grupos controles a los cuales no se les aplicó presión en el torniquete ($n = 6$, para cada grupo control). En los grupos experimentales de isquemia se realizó una hora de registro sin isquemia (torniquete sin insuflar) tomando medidas de la sacudida simple cada diez minutos. Después de 1 hora se indujo isquemia en ambos grupos musculares (SOL y ERLC) a través de la insuflación de aire en los dos torniquetes durante 1, 2 y 3 horas tal como se muestra en la figura 10.

Grupo isquemia 1



Grupo isquemia 2



Grupo isquemia 3

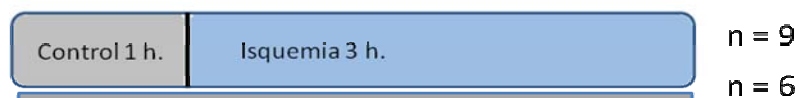
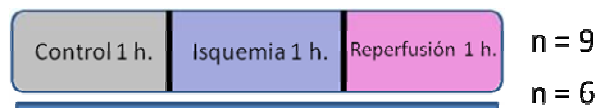


Figura 10. Grupos experimentales de caracterización de la sacudida simple durante la isquemia.

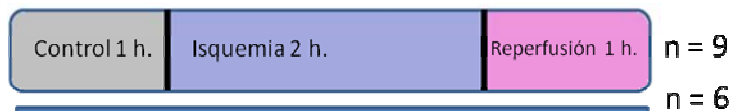
4.6.2. Caracterización de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo SOL y en el músculo ERLC durante 1, 2, y 3 horas de isquemia seguidas de 1 hora de reperfusión.

Se hicieron registros de 3 grupos experimentales de isquemia a 1, 2 y 3 horas (n= 9, para cada tiempo) y 3 grupos controles a los cuales no se les aplicó presión en el torniquete (n=6, para cada grupo control). En los grupos experimentales luego del tiempo de isquemia se registró por una hora más durante la reperfusión de los músculos, en los grupos control se hizo una hora equivalente de registro (ver figura 11). En los grupos experimentales, se realizó una hora de registro sin isquemia (torniquete sin insuflar) tomando medidas de la sacudida simple cada diez minutos. Después de la hora se indujo isquemia en ambos grupos musculares (SOL y ERLC) a través de la insuflación de aire en los dos torniquetes durante 1, 2 y 3 horas tal como se muestra en la figura 11. Terminado el tiempo de la isquemia, los torniquetes se desinflaron hasta una presión de 0 mm Hg para inducir la reperfusión, la cual se mantuvo durante una hora en todos los grupos experimentales como se muestra en la figura 11.

Grupo isquemia 1 h. reperfusión.



Grupo isquemia 2h. Reperfusión.



Grupo isquemia 3h. Reperfusión.



Figura 11. Grupos experimentales de caracterización de la sacudida simple durante la isquemia-reperfusión.

4.6.3. Caracterización de las diferencias significativas que presentan los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple durante isquemia-reperfusión, entre el músculo SOL y el músculo ERLC.

Considerando que los parámetros funcionales que se midieron y analizaron para ambos grupos musculares presentaron amplitudes, tiempos y tasas de diferente magnitud, con el fin de comparar estos datos fue necesario normalizar todas las mediciones obtenidas de cada animal con los valores iniciales obtenidos en cada experimento. Para el análisis de las diferencias observadas en los efectos en la función muscular durante la isquemia y la isquemia-reperfusión a diferentes tiempos, los resultados obtenidos con ambos grupos musculares se han comparado con los resultados obtenidos con los grupos control. Se comparó estadísticamente la homogeneidad de varianzas a través

de la prueba de Levene con el programa (StatSoft Sewss Statistica 7.0) donde se rechaza la hipótesis que las varianzas sean iguales con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Posterior a este análisis se compararon ambos grupos musculares (SOL y ERLC) con los grupos controles a través de la utilización de la prueba t de Student donde $p < 0,05$, para dos muestras suponiendo varianzas iguales o varianzas desiguales en dependencia de los resultados de la prueba de Levene. Para la comparación de los resultados entre ambos grupos musculares y se representaron todos los datos como un porcentaje de los valores iniciales y se procedió con el mismo análisis estadístico.

5. RESULTADOS.

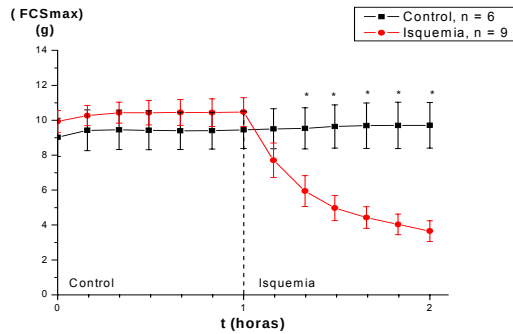
5.1. Caracterización de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo SOL y en el músculo ERLC durante 1, 2, y 3 horas de isquemia.

5.1.1. Músculo Soleo (SOL):

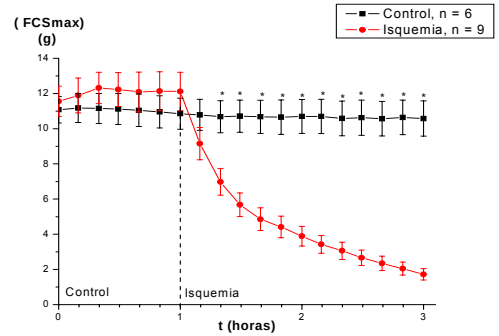
En la figura 12 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio de la ΔF_{CSmax} luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y en el C luego de 3 horas de isquemia. En estos paneles se observa que mientras la ΔF_{CSmax} permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a isquemia (rombos rojos), la ΔF_{CSmax} cae en proporción a la duración del tiempo de isquemia. La ΔF_{CSmax} normal para el SOL fue alrededor de $9,5 \pm 2,9$ g (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En los tres grupos se observa que la caída de la ΔF_{CSmax} es inmediata en la primera sacudida registrada luego de inducir la isquemia, la cual se hizo 10 minutos después de aumentar la presión en el torniquete. En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la ΔF_{CSmax} en cada punto de la curva fue normalizada con la ΔF_{CSmax} medida a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, la ΔF_{CSmax} cae un 70% durante la primera hora de isquemia, 20% más durante la segunda hora de isquemia y el 10% restante durante la tercera hora de isquemia. Al final del experimento la ΔF_{CSmax} es prácticamente cero.

En la figura 13 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la integral fuerza_(sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio de la $\int F_{CS(t)}$ luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y en el C luego de 3 horas de isquemia. En estos paneles se observa que mientras la $\int F_{CS(t)}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a isquemia (rombos rojos), la $\int F_{CS(t)}$ cae en proporción a la duración del tiempo de isquemia. La $\int F_{CS(t)}$ para el SOL fue alrededor de $1,1 \pm 0,4$ g*s (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En los tres grupos se observa que la caída de la $\int F_{CS(t)}$ es inmediata en la primera sacudida registrada luego de inducir la isquemia, la cual se hizo 10 minutos después de aumentar la presión en el torniquete. En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $\int F_{CS(t)}$ en cada punto de la curva fue normalizada con la $\int F_{CS(t)}$ medida a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, la $\int F_{CS(t)}$ cae un 70% durante la primera hora de isquemia, 20% más durante la segunda hora de isquemia y el 10% restante durante la tercera hora de isquemia. Al final del experimento la $\int F_{CS(t)}$ es prácticamente cero. Estos resultados son muy similares a los cambios observados en la ΔF_{CSmax} y sugieren que las dos mediciones son válidas para caracterizar los cambios en el desempeño muscular.

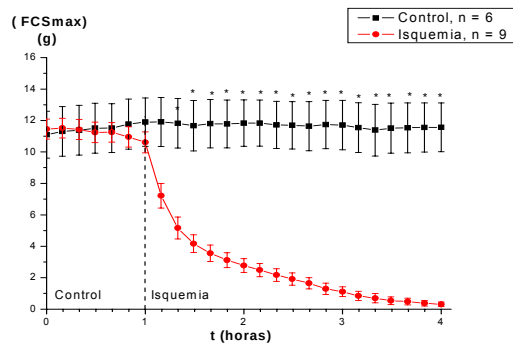
A.



B.



C.



D.

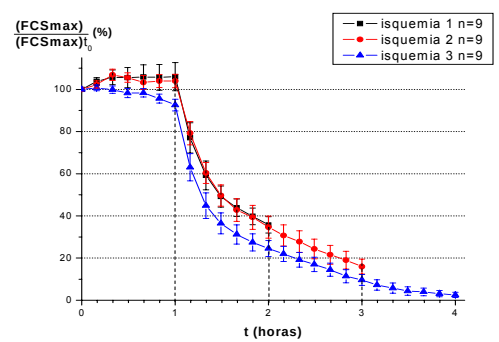
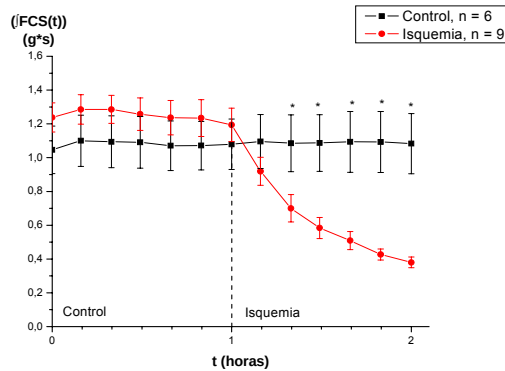


Figura 12. Fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia (●). **D)** (ΔF_{CSmax}) normalizada por la (ΔF_{CSmax}) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

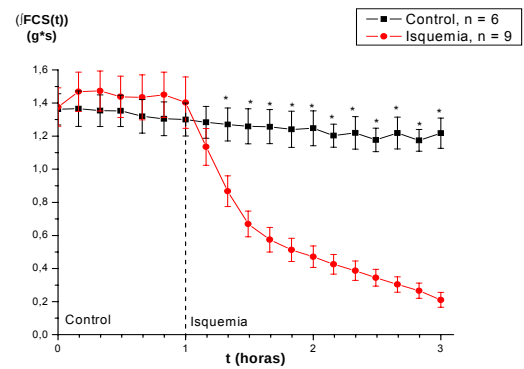
En la figura 14 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CSlaten.}$ luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y en el C luego de 3 horas de isquemia. En estos paneles se observa que mientras el $\Delta t_{CSlaten.}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a isquemia (rombos rojos), el $\Delta t_{CSlaten.}$ aumenta en proporción a la duración del tiempo de isquemia. El $\Delta t_{CSlaten.}$ para el SOL fue alrededor de $10,4 \pm 1,1$ ms (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En los tres grupos se observa que el aumento del $\Delta t_{CSlaten.}$ es inmediato en la primera sacudida registrada luego de inducir la isquemia, la cual se hizo 10 minutos después de aumentar la presión en el torniquete. En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CSlaten.}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CSlaten.}$ medido a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, el $\Delta t_{CSlaten.}$ aumenta tónicamente un 50% durante la primera hora de isquemia, alcanzando un incremento máximo del 90% luego de 1 hora y 40 minutos de

isquemia, tiempo después del cual la varianza de los datos aumento considerablemente, sugiriendo un deterioro en las variables que controlan este parámetro a partir de este punto. El incremento máximo del 100% se observa a las 2 horas de isquemia, observándose una caída en los valores durante la 3 hora de isquemia, cuando prácticamente regresa a su valor inicial de control, pero mostrando una gran dispersión de los datos.

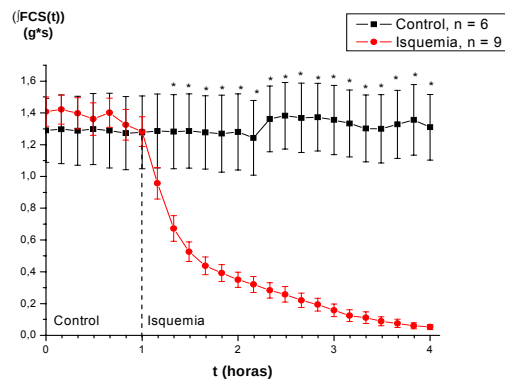
A.



B.



C.



D.

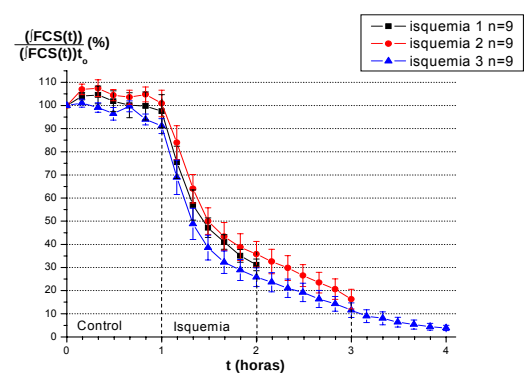
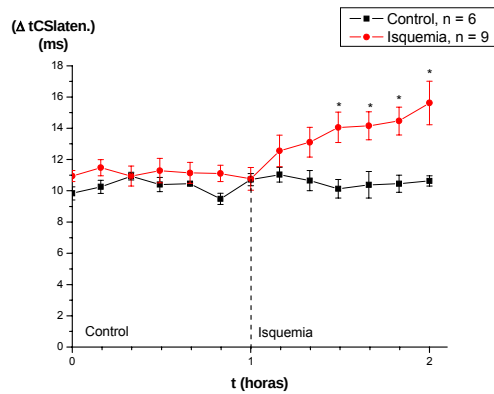


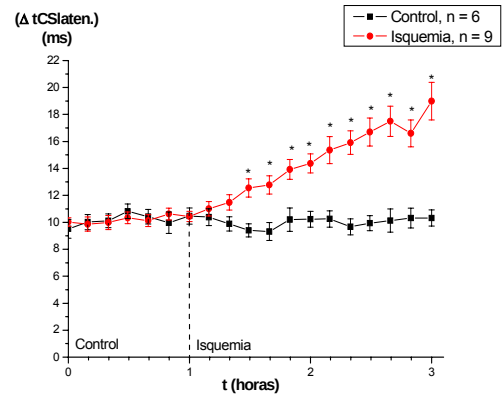
Figura 13. Integral fuerza_(sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS}(t)$) en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia (●). D) ($\int F_{CS}(t)$) normalizada por la ($\int F_{CS}(t)$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 15 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CScont.}$ luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y en el C luego de 3 horas de isquemia.

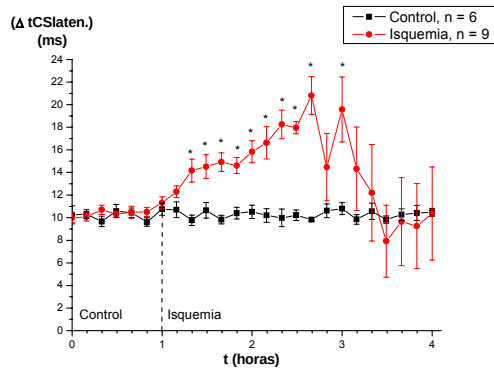
A.



B.



C.



D.

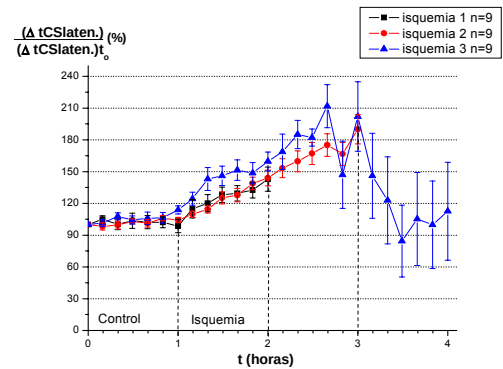
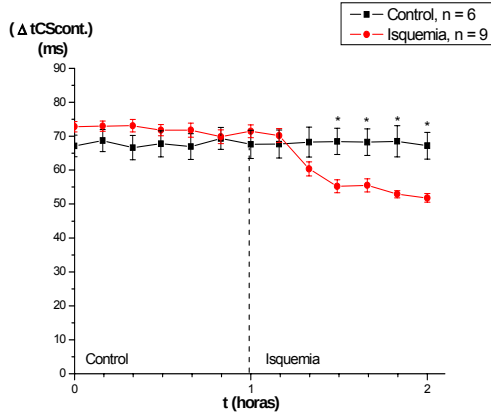


Figura 14. Tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia (●). **D)** ($\Delta t_{CSlaten.}$) normalizada por el ($\Delta t_{CSlaten.}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, p < 0.05).

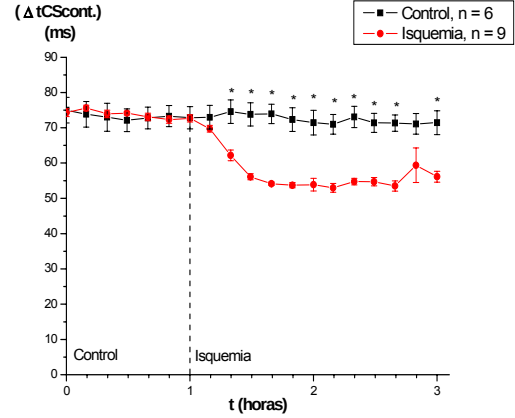
En estos paneles se observa que mientras el $\Delta t_{CScont.}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a isquemia (rombos rojos), el $\Delta t_{CScont.}$ se mantiene en sus niveles normales durante los primeros 10 minutos en isquemia, cae a partir de los 20 minutos en isquemia y se estabiliza en un valor más bajo hacia los 30 minutos en isquemia, permaneciendo allí hasta las 2 primeras horas de isquemia. A partir de este momento la varianza en los datos aumenta considerablemente sugiriendo un deterioro en las variables que controlan este parámetro a partir de este punto. El $\Delta t_{CScont.}$ para el SOL fue alrededor de $67,9 \pm 9,4$ ms (media $\pm$ s.e.m., n = 6). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CScont.}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CScont.}$ medido a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, el $\Delta t_{CScont.}$ se mantiene estable durante los primeros 10 minutos de isquemia, luego cae un 18% a los 20 minutos de isquemia, para luego caer un 25% hacia los 30 minutos de

isquemia, donde permanece estable hasta los 120 minutos de isquemia, tiempo después del cual se observa una nueva caída, llegando a un descenso total de un 65% de los valores normales.

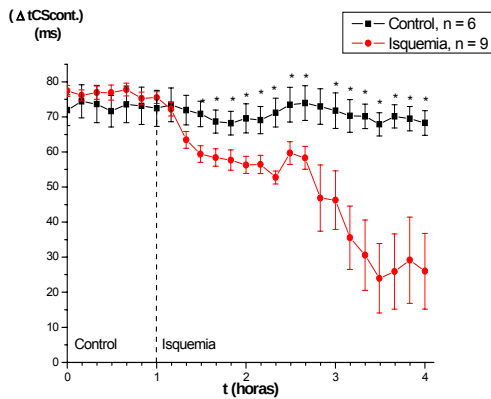
A.



B.



C.



D.

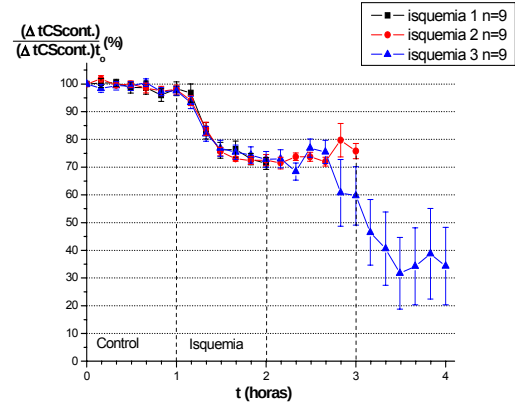
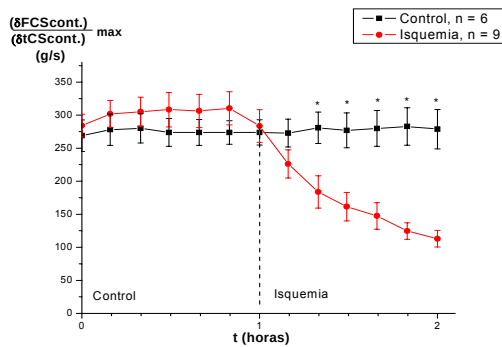


Figura 15. Tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia (●). **D)** ($\Delta t_{CScont.}$) normalizada por el ($\Delta t_{CScont.}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

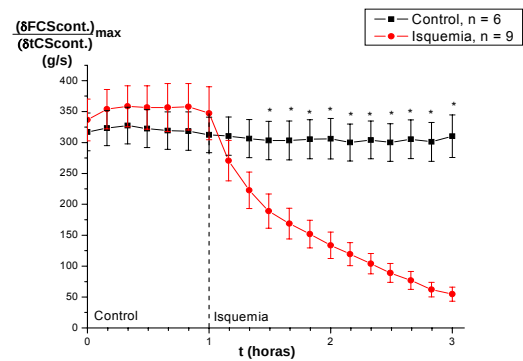
En la figura 16 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la tasa máxima de contracción ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio de la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y en el C luego de 3 horas de isquemia. En estos paneles se observa que mientras la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a isquemia (rombos rojos), la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ disminuye en proporción a la

duración del tiempo de isquemia. La $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ para el SOL fue alrededor de $276,5 \pm 57,2$ g/s (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En los tres grupos se observa que la disminución de la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ es inmediata en la primera sacudida registrada luego de inducir la isquemia, la cual se hizo 10 minutos después de aumentar la presión en el torniquete. En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en cada punto de la curva fue normalizada con la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ medida a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ disminuye un 65% durante la primera hora de isquemia, 20% más durante la segunda hora de isquemia y un 10% adicional durante la tercera hora de isquemia. Al final del experimento la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ es de un 5% del valor inicial.

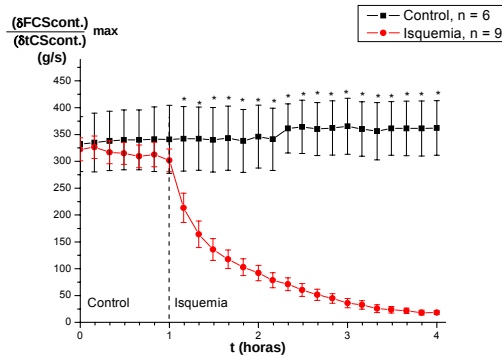
A.



B.



C.



D.

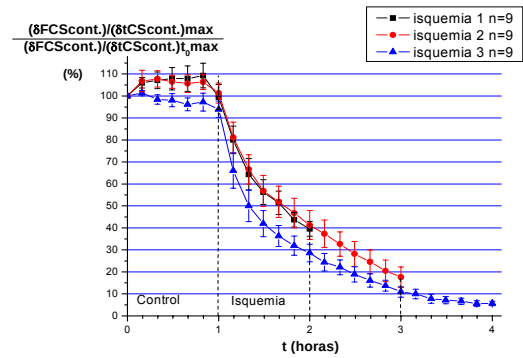
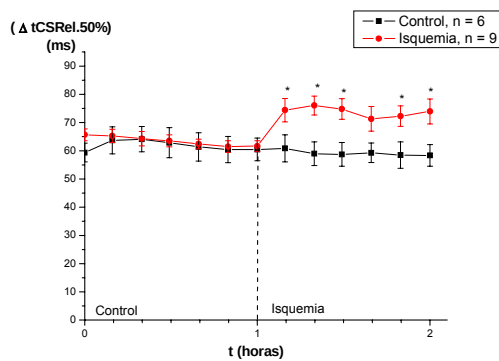


Figura 16. Tasa máxima de contracción $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia (●). **D)** $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ normalizada por la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

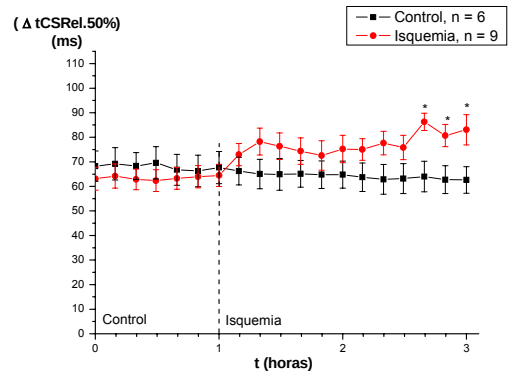
En la figura 17 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio del

$\Delta t_{\text{CSRel.50\%}}$ luego de 1 hora de ischemia, en el B luego de 2 horas de ischemia y en el C luego de 3 horas de ischemia. En estos paneles se observa que mientras el $\Delta t_{\text{CSRel.50\%}}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a ischemia (rombos rojos), el $\Delta t_{\text{CSRel.50\%}}$ aumenta a los 10 minutos de ischemia y se mantiene estable en ese punto hasta las 1,5 horas en ischemia, tiempo después del cual la varianza en los datos aumenta considerablemente y se observa una caída en el valor que aun continua a las 3 horas de ischemia. Las diferencias entre los grupos experimentales y los grupos control no son siempre significativas, por lo cual los cambios observados hasta las 1,5 horas en ischemia deben ser registrados como una tendencia. El $\Delta t_{\text{CSRel.50\%}}$ para el SOL fue alrededor de $60,5 \pm 10,7$ ms (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{\text{CSRel.50\%}}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{\text{CSRel.50\%}}$ medido a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, el cambio observado en las primeras 1,5 horas de ischemia corresponde a un aumento del 20%. A las tres horas de ischemia la caída en el $\Delta t_{\text{CSRel.50\%}}$ es en promedio de un 40%.

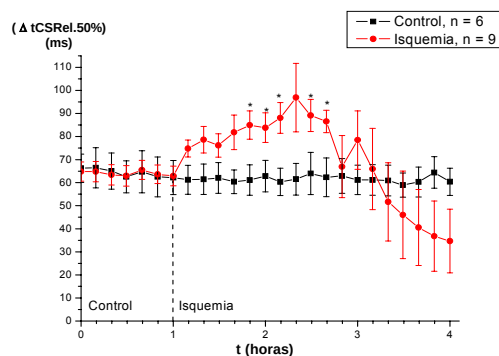
A.



B.



C.



D.

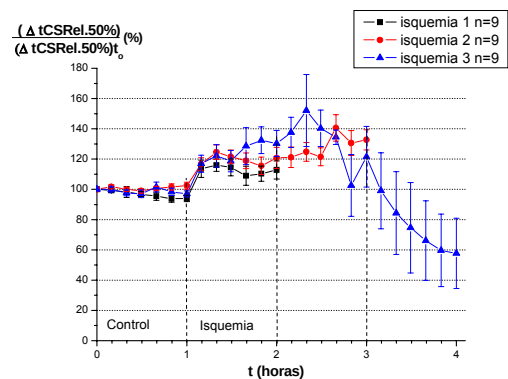
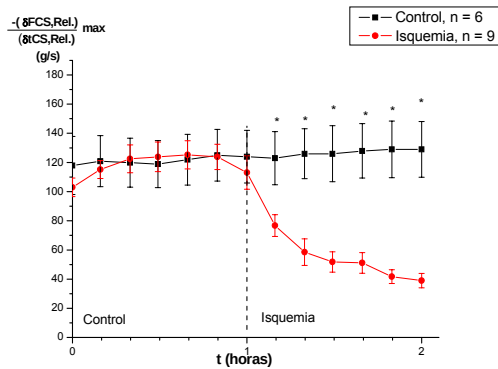


Figura 17 (arriba). Tiempo medio de relajación ($\Delta t_{\text{CSRel.50\%}}$) en función del tiempo de ischemia para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de ischemia (●).

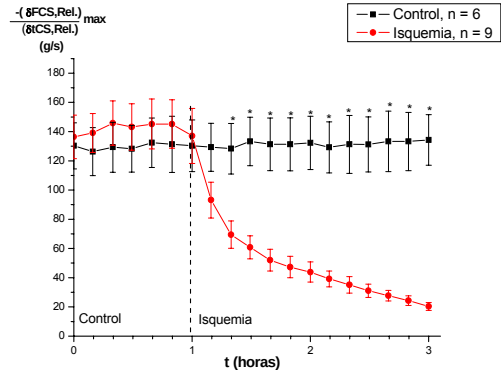
de isquemia (●). **D)** $(\Delta t_{CS,Rel.50\%})$ normalizada por el $(\Delta t_{CS,Rel.50\%})$ a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 18 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la tasa máxima de relajación $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio del $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y en el C luego de 3 horas de isquemia. En estos paneles se observa que mientras la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a isquemia (rombos rojos), la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ disminuye en forma bifásica en función a la duración del tiempo de isquemia. Todos los datos han sido multiplicados por (-1) para su presentación. La $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ para el SOL fue alrededor de $-123,8 \pm 44,3$ g/s (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En los tres grupos se observa que la disminución de la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ es inmediata en la primera sacudida registrada luego de inducir la isquemia, la cual se hizo 10 minutos después de aumentar la presión en el torniquete. En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en cada punto de la curva fue normalizada con la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ medida a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ disminuye un 40% durante los primeros 20 minutos de isquemia y luego la caída se hace más lenta. Durante la primera hora la disminución es de 75%, un 7% adicional durante la segunda hora y un 3% adicional durante la tercera hora de isquemia. Al final del experimento la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ es de un 5% del valor inicial.

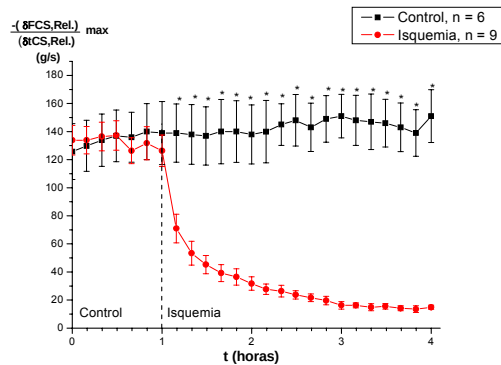
A.



B.



C.



D.

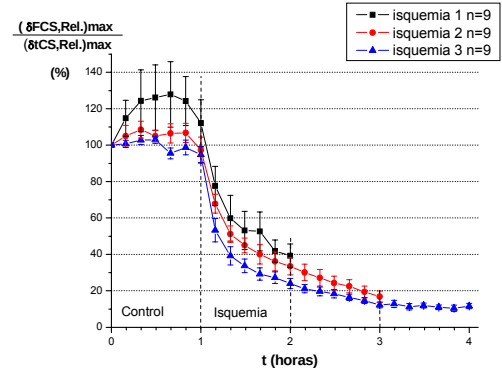


Figura 18 (abajo). Tasa máxima de relajación $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia (●). D) $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ normalizada por la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

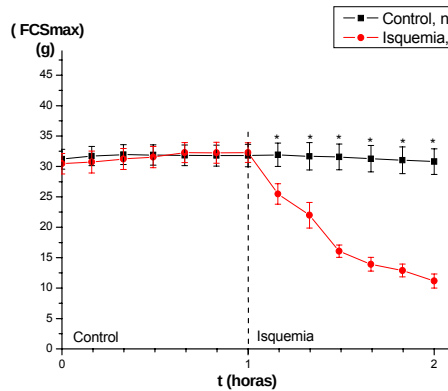
5.1.2. Músculo Extensor radial largo del carpo (ERLC):

En la figura 19 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio de la ΔF_{CSmax} luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y en el C luego de 3 horas de isquemia. En estos paneles se observa que mientras la ΔF_{CSmax} permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a isquemia (rombos rojos), la ΔF_{CSmax} cae en proporción a la duración del tiempo de isquemia. La ΔF_{CSmax} normal para el ERLC fue alrededor de $31,6 \pm 4,6$ g (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En los tres grupos se observa que la caída de la ΔF_{CSmax} es inmediata en la primera sacudida registrada luego de inducir la isquemia, la cual se hizo 10 minutos después de aumentar la presión en el torniquete. En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la ΔF_{CSmax} en cada punto de la curva fue normalizada con la ΔF_{CSmax} medida a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, la ΔF_{CSmax} cae un 70% durante la primera hora de isquemia y 30% más durante la segunda hora de isquemia. Durante la tercera hora de isquemia y final del experimento la ΔF_{CSmax} es prácticamente cero.

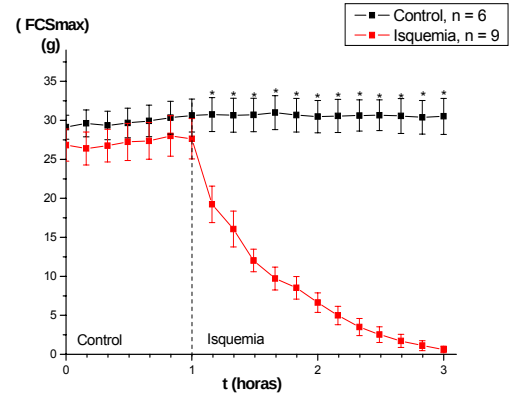
En la figura 20 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la integral fuerza_(sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio de la $\int F_{CS(t)}$ luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y en el C luego de 3 horas de isquemia. En estos paneles se observa que mientras la $\int F_{CS(t)}$ permanece estable en los grupos control

(cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a isquemia (rombos rojos), la $\int F_{CS(t)}$ cae en proporción a la duración del tiempo de isquemia. La $\int F_{CS(t)}$ para el ERLC fue alrededor de $1,1 \pm 0,2 \text{ g}^*s$ (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En los tres grupos se observa que la caída de la $\int F_{CS(t)}$ es inmediata en la primera sacudida registrada luego de inducir la isquemia, la cual se hizo 10 minutos después de aumentar la presión en el torniquete. En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $\int F_{CS(t)}$ en cada punto de la curva fue normalizada con la $\int F_{CS(t)}$ medida a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, la $\int F_{CS(t)}$ cae un 70% durante la primera hora de isquemia, 25% más durante la segunda hora de isquemia y el 5% restante durante la tercera hora de isquemia. Al final del experimento la $\int F_{CS(t)}$ es prácticamente cero.

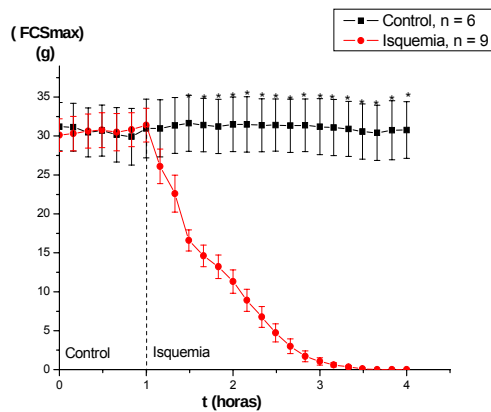
A.



B.



C.



D.

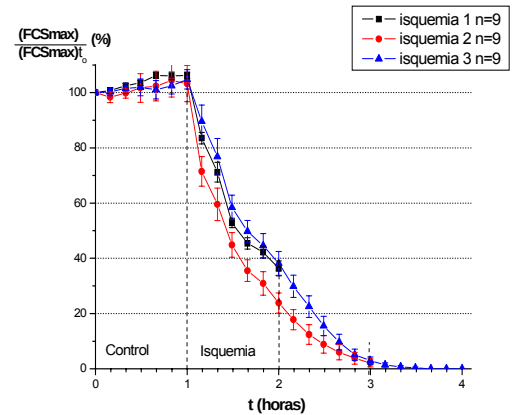
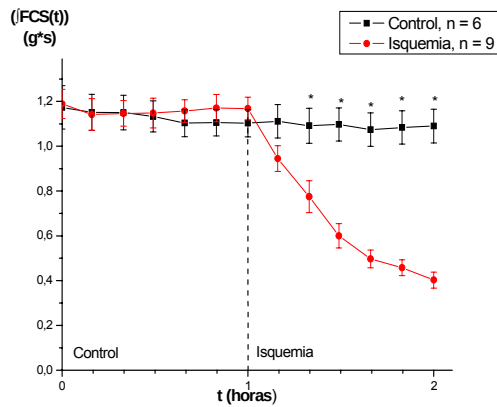
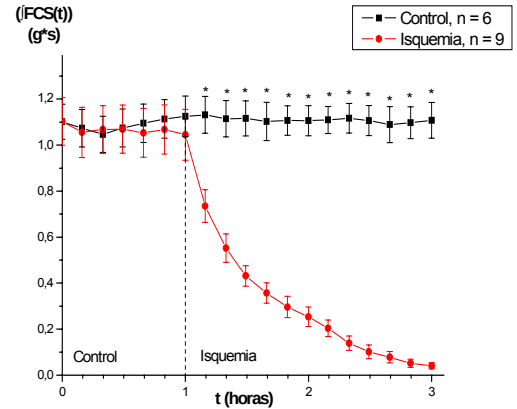


Figura 19. Fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia para el músculo para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia (●). D) (ΔF_{CSmax}) normalizada por la (ΔF_{CSmax}) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

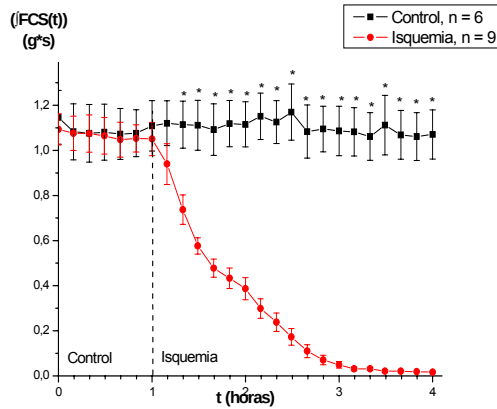
A.



B.



C.



D.

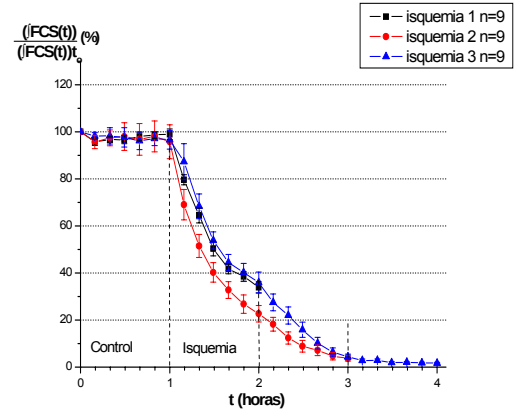
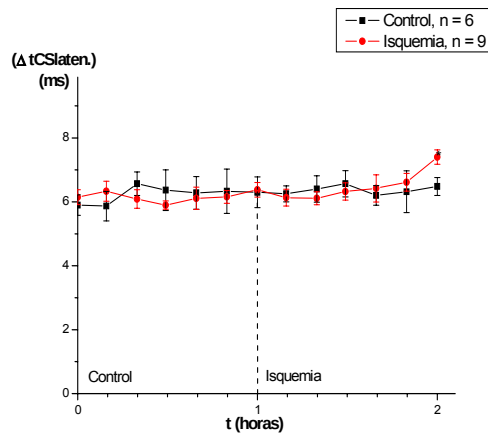


Figura 20. Integral fuerza (sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($J_{FCS(t)}$) en función del tiempo de ischemia para el músculo ERLC. . **A)** Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de ischemia (●). **D)** ($J_{FCS(t)}$) normalizada por la ($J_{FCS(t)}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de ischemia (■), grupo a 2 horas de ischemia (●), grupo a 3 horas de ischemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

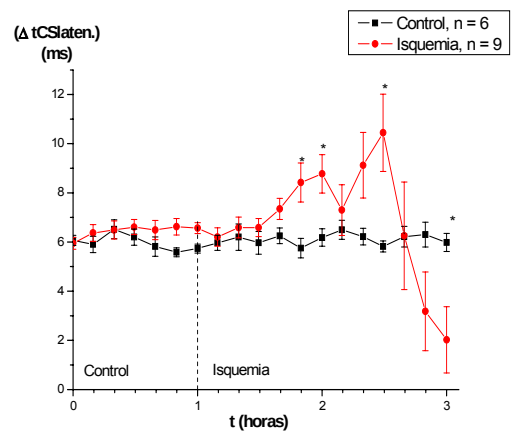
En la figura 21 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de ischemia para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CSlaten.}$ luego de 1 hora de ischemia, en el B luego de 2 horas de ischemia y en el C luego de 3 horas de ischemia. En estos paneles se observa que mientras el $\Delta t_{CSlaten.}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a ischemia (rombos rojos), el $\Delta t_{CSlaten.}$ Primero se mantiene estable, luego aumenta en proporción a la duración del tiempo de ischemia y finalmente cae a cero, mostrando una gran varianza en esta fase final. El $\Delta t_{CSlaten.}$ para el ERLC fue alrededor de $6,3 \pm 1,1$ ms (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En los tres grupos se observa que el $\Delta t_{CSlaten.}$ Se mantiene estable durante

los primeros 40-50 minutos de isquemia y luego empieza a aumentar hasta en un 50% a los 80-90 minutos de isquemia, tiempo después del cual se observa un incremento en la varianza de los datos y una caída de los valores hasta cero hacia los 140 minutos, tiempo después del cual no se observa ninguna recuperación. En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CSlaten.}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CSlaten.}$ medido a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, el $\Delta t_{CSlaten.}$ aumenta pero la significancia estadística de estos aumentos es variable.

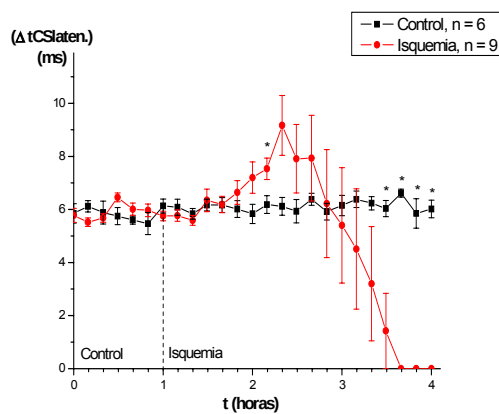
A.



B.



C.



D.

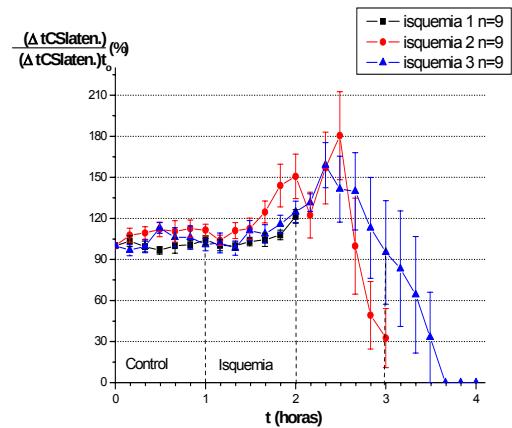
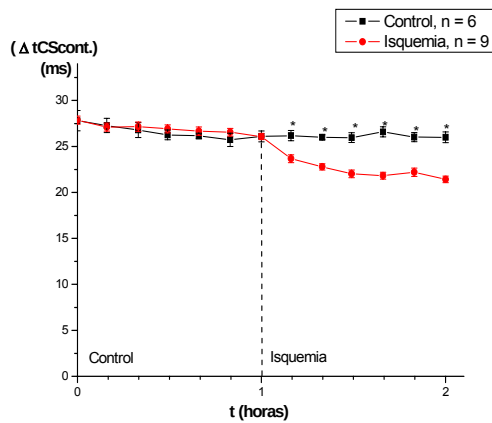


Figura 21. Tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia (●). D) ($\Delta t_{CSlaten.}$) normalizada por el ($\Delta t_{CSlaten.}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

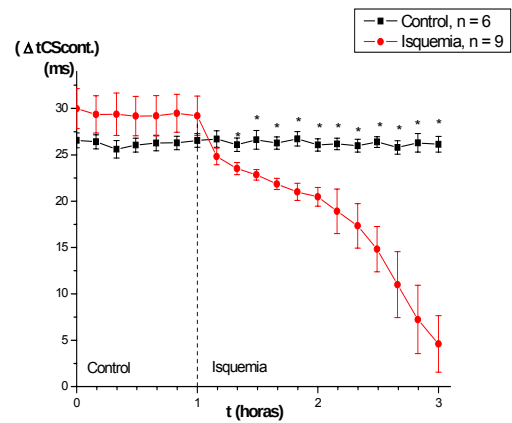
En la figura 22 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de isquemia

para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CScont.}$ luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y en el C luego de 3 horas de isquemia. En estos paneles se observa que mientras el $\Delta t_{CScont.}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a isquemia (rombos rojos), el $\Delta t_{CScont.}$ disminuye su de su valor normal una vez se instaura la isquemia. La caída continúa y se estabiliza hacia los 30 minutos en isquemia, permaneciendo allí hasta que se completa la primera hora de isquemia. A partir de este momento la varianza en los datos aumenta considerablemente y el parámetro registra un descenso continuo, llegando a cero a las 2 horas y 40 minutos, sin mostrar una recuperación posterior. El $\Delta t_{CScont.}$ para el ERLC fue alrededor de $26,3 \pm 1,5$ ms (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CScont.}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CScont.}$ medido a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, el $\Delta t_{CScont.}$ cae un 14% durante los primeros 10 minutos de isquemia, luego cae un 3% adicional los 20 minutos de isquemia. La disminución se estabiliza en un 20% hacia los 30 minutos de isquemia, donde permanece estable hasta los 60 minutos de isquemia.

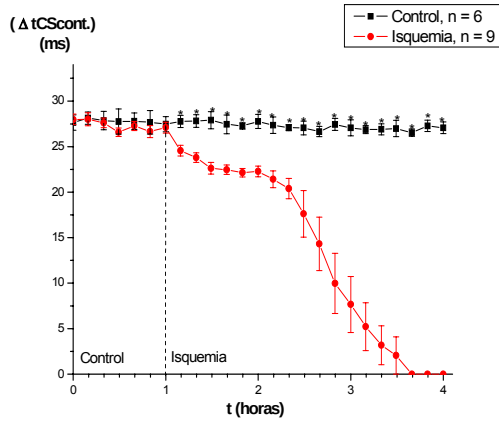
A.



B.



C.



D.

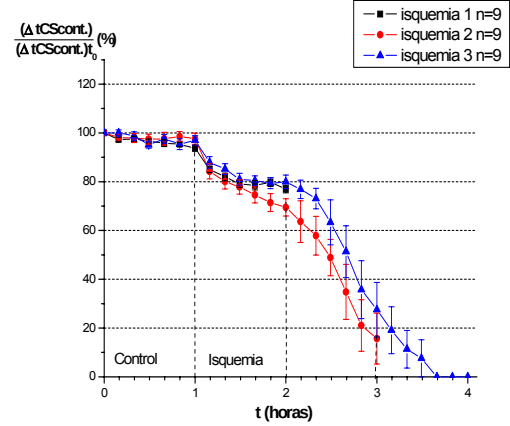


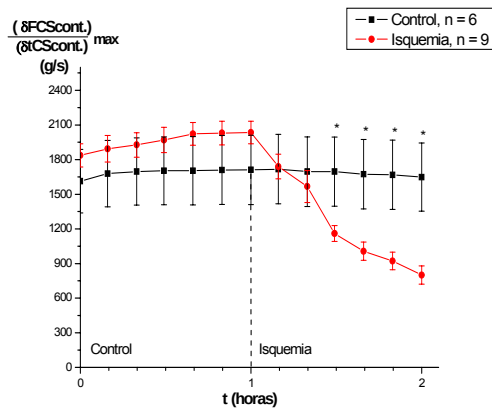
Figura 22. Tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia (●). D) ($\Delta t_{CScont.}$) normalizada por el ($\Delta t_{CScont.}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 23 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la tasa máxima de contracción $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio de la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y en el C luego de 3 horas de isquemia. En estos paneles se observa que mientras la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a isquemia (rombos rojos), la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ disminuye en proporción a la duración del tiempo de isquemia. La $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ promedio para el ERLC fue alrededor de $1966,6 \pm 258,8$ g/s (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En los tres grupos se observa que la disminución de la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ es inmediata en la primera sacudida registrada luego de inducir la isquemia, la cual se hizo 10 minutos después de aumentar la presión en el torniquete. En el panel D (figura 23) se muestra el resumen de estos resultados, donde la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en cada punto de la curva fue normalizado con la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ medida a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ disminuye un 60% durante la primera hora de isquemia, 35% más durante la segunda hora de isquemia y un 5% adicional durante la tercera hora de isquemia. Al final del experimento la $\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ es un 2% del valor inicial.

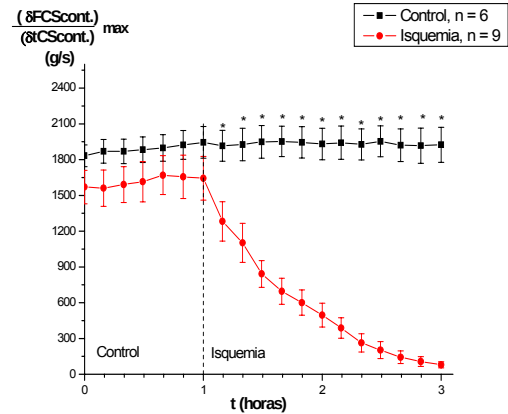
En la figura 24 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CSRel.50\%}$ luego de 1 hora de isquemia, en el B luego de 2 horas de isquemia y

en el C luego de 3 horas de ischemia. En estos paneles se observa que mientras el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a ischemia (rombos rojos), el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ disminuye a los 10 minutos de ischemia, alcanzando su caída máxima a los 20 minutos de ischemia, luego se mantiene estable en ese punto hasta los 90-100 minutos en ischemia, tiempo después del cual se observa una caída en el valor que llega hasta cero a los 160 minutos. Las diferencias observadas entre los grupos experimentales y los grupos control no son siempre significativas. El $\Delta t_{CSRel.50\%}$ promedio para el ERLC fue alrededor de $17,6 \pm 2$ ms (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ medido a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, la caída en los primeros 10 minutos de ischemia es de un 17%, llegando a caer hasta un 27% a los minutos. En adelante la varianza es muy elevada y los datos informan muy poco acerca del comportamiento de este parámetro.

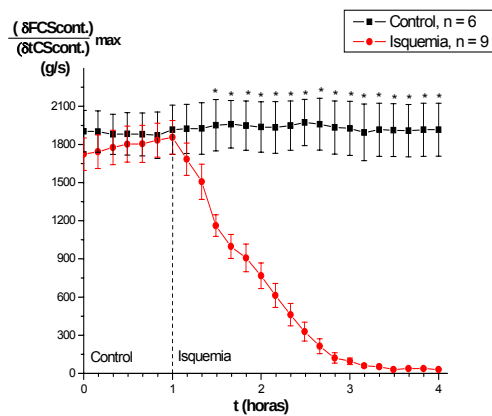
A.



B.



C.



D.

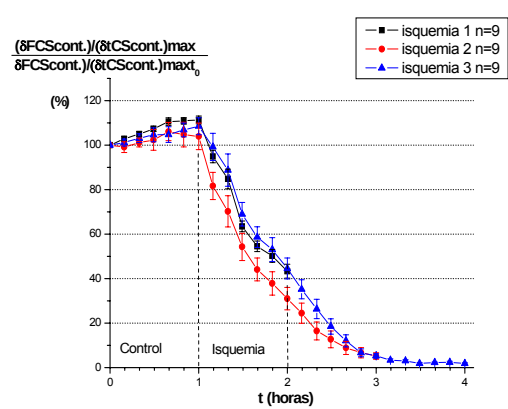
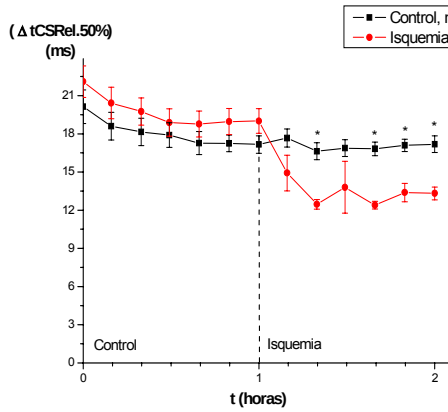


Figura 23. Tasa máxima de contracción $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de ischemia para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia (●). B)

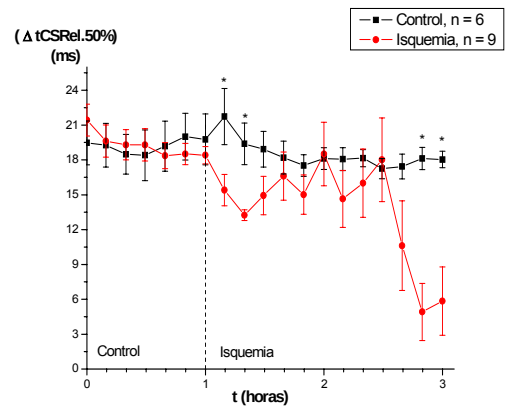
Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de ischemia (●). **D)** $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ normalizada por la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ a tiempo cero. Grupo a 1 hora de ischemia (■), grupo a 2 horas de ischemia (●), grupo a 3 horas de ischemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 25 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la tasa máxima de relajación $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en función del tiempo de ischemia para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio del $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ luego de 1 hora de ischemia, en el B luego de 2 horas de ischemia y en el C luego de 3 horas de ischemia. En estos paneles se observa que mientras la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ permanece estable en los grupos control (cuadrados negros), en los grupos de animales que fueron sometidos a ischemia (rombos rojos), la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ se mantiene en los valores normales durante 20 minutos y a partir de allí empieza tónicamente a disminuir hasta alcanzar valores cercanos a cero a las dos horas de ischemia.

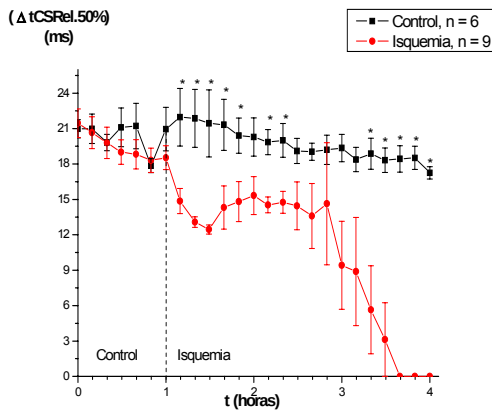
A.



B.



C.



D.

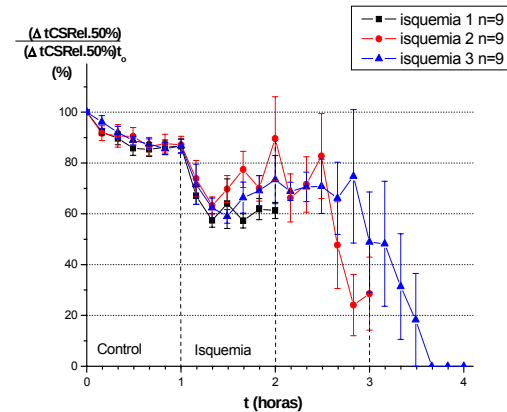
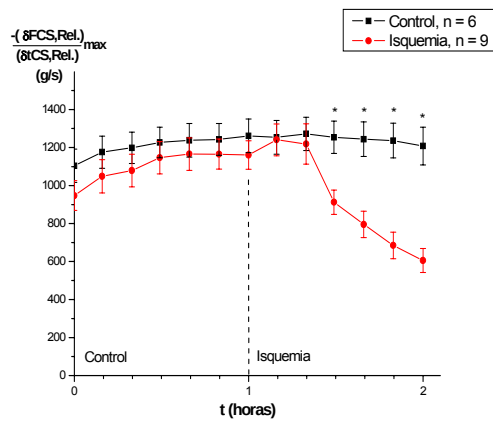


Figura 24. Tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de ischemia para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de

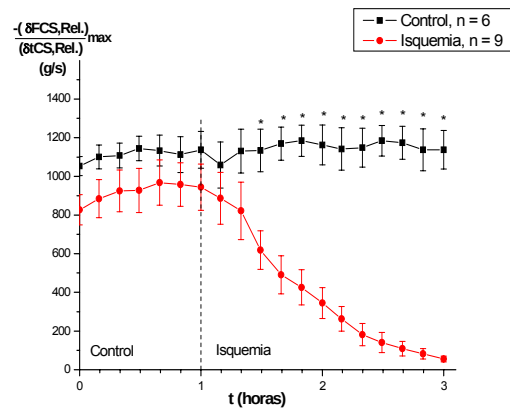
isquemia (●). **D)** $(\Delta t_{CS,Rel.50\%})$ normalizada por el $(\Delta t_{CS,Rel.50\%})$ a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

Todos los datos han sido multiplicados por (-1) para efectos demostrativos. La $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ promedio para el ERLC fue alrededor de $-1224,5 \pm 214,8$ g/s (media $\pm$ s.e.m., $n = 6$). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en cada punto de la curva fue normalizado con la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ medida a tiempo cero. Este análisis indica que en promedio, la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ se mantiene estable durante los primeros 20 minutos de isquemia y luego inicia una caída que aparenta tener un solo componente. Durante la primera hora la disminución es de 50%, un 46% adicional durante la segunda hora y un 3% adicional durante la tercera hora de isquemia. Al final del experimento la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ es muy cercana a cero.

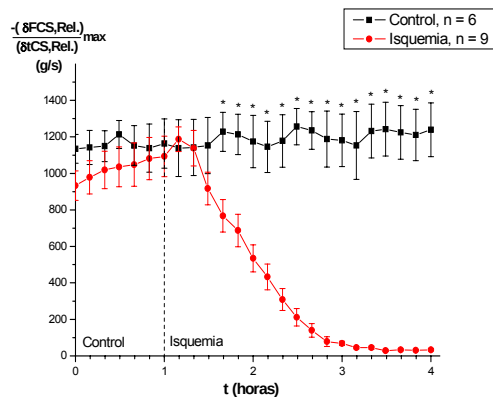
A.



B.



C.



D.

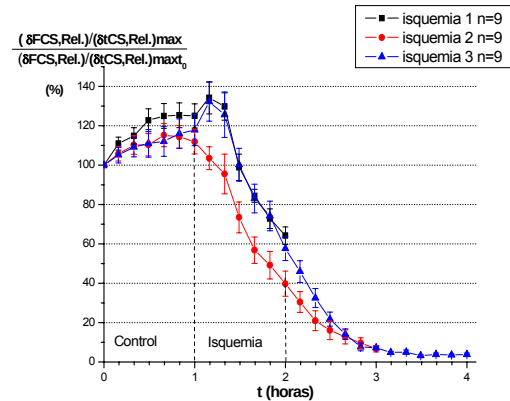


Figura 25. Tasa máxima de relajación $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas

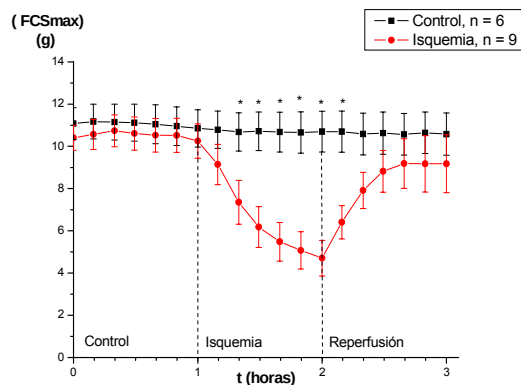
de isquemia (●). **D)** $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ normalizada por la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia (■), grupo a 2 horas de isquemia (●), grupo a 3 horas de isquemia (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

5.2. Caracterización de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple en el músculo SOL y en el músculo ERLC durante 1, 2, y 3 horas de isquemia seguidas de 1 hora de reperfusión.

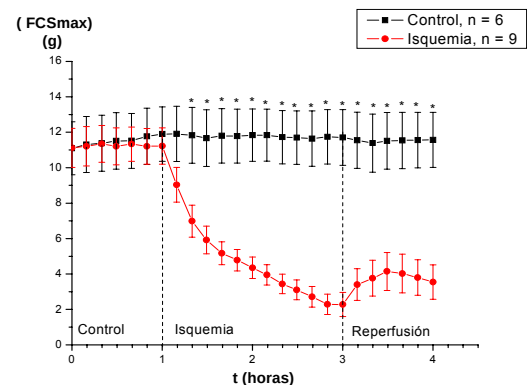
5.2.1. Músculo Soleo (SOL):

En la figura 26 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia, seguidos de 1 hora de reperfusión para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio de la ΔF_{CSmax} luego de 1 hora de isquemia y 1 hora de reperfusión, en el B luego de 2 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión, y en el C luego de 3 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión. El comportamiento de los periodos de isquemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que la ΔF_{CSmax} permanece estable en los grupos control durante la isquemia y la reperfusión (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la ΔF_{CSmax} en cada punto de la curva fue normalizada con la ΔF_{CSmax} medida a tiempo cero. Luego de 1 hora de isquemia, la ΔF_{CSmax} se recupera 45% en los primeros 30 minutos, sin hacerlo más durante la siguiente media hora de reperfusión. Después de 2 horas de isquemia, la ΔF_{CSmax} se recupera 18% en los primeros 30 minutos, sin hacerlo más durante la siguiente media hora de reperfusión. Luego de 3 horas de isquemia la ΔF_{CSmax} no se recupera durante 1 hora de reperfusión.

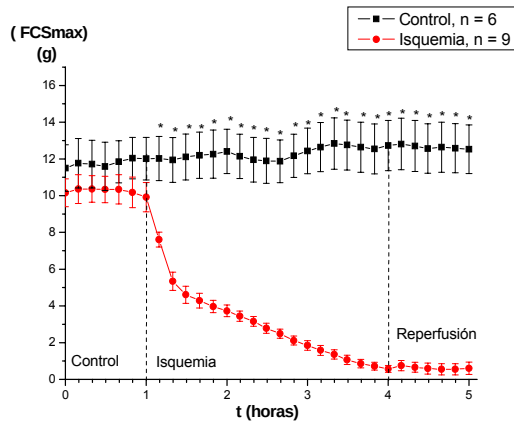
A.



B.



C.



D.

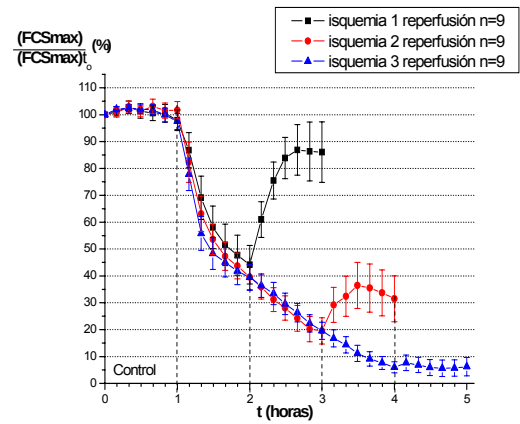


Figura 26. Fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de ischemia-reperfusión para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperfusion (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●). D) (ΔF_{CSmax}) normalizada por la (ΔF_{CSmax}) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperfusion (■); grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●); grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 27 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la integral fuerza_(sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) en función del tiempo de ischemia, seguidos de 1 hora de reperfusion para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio de la $\int F_{CS(t)}$ luego de 1 hora de ischemia y 1 hora de reperfusion, en el B luego de 2 horas de ischemia y 1 hora de reperfusion, y en el C luego de 3 horas de ischemia y 1 hora de reperfusion. El comportamiento de los periodos de ischemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que la $\int F_{CS(t)}$ permanece estable en los grupos control durante la ischemia y la reperfusion (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $\int F_{CS(t)}$ en cada punto de la curva fue normalizada con la $\int F_{CS(t)}$ medida a tiempo cero. Luego de 1 hora de ischemia, la $\int F_{CS(t)}$ se recupera 45% en los primeros 20 minutos, sin hacerlo más durante la siguiente media hora de reperfusion. Después de 2 horas de ischemia, la $\int F_{CS(t)}$ se recupera 18% en los primeros 20 minutos, sin hacerlo más durante la siguiente media hora de reperfusion. Luego de 3 horas de ischemia la $\int F_{CS(t)}$ no se recupera durante 1 hora de reperfusion.

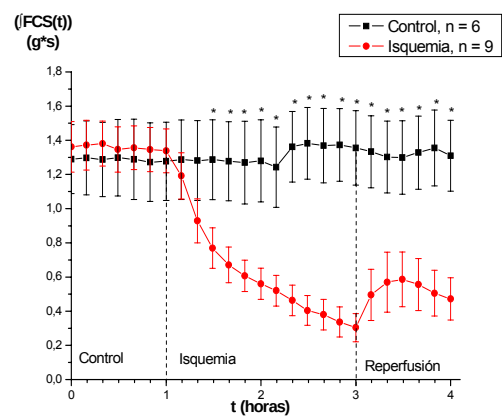
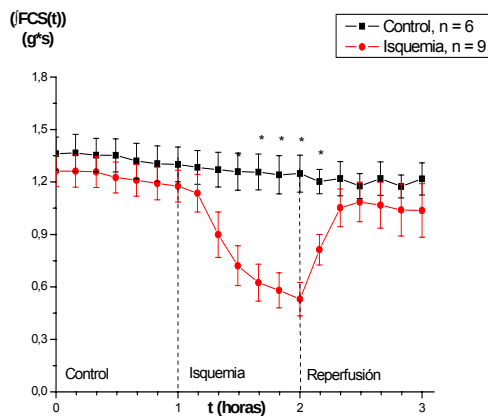
En la figura 28 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de ischemia, seguidos de 1 hora de reperfusion para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CSlaten.}$ luego de 1 hora de ischemia y 1 hora de reperfusion, en el B luego de 2 horas de ischemia y 1 hora de reperfusion, y en el C luego de 3 horas de ischemia y 1 hora de reperfusion. El comportamiento de los periodos de ischemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que el $\Delta t_{CSlaten.}$ permanece estable en los grupos control durante la ischemia y la

reperfusión (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CSlaten.}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CSlaten.}$ medido a tiempo cero. Luego de 1 hora de isquemia, el $\Delta t_{CSlaten.}$ retorna hacia sus valores normales en 20 minutos, pero mantiene una tendencia a permanecer ligeramente elevado, la cual no es estadísticamente significativa. Luego de dos horas de isquemia el $\Delta t_{CSlaten.}$ se mantiene elevado, no cambia y muestra una gran varianza, indicando que aparentemente no hay recuperación. Luego de 2 horas y 20 minutos de isquemia el $\Delta t_{CSlaten.}$ aumenta hasta un 110% de su valor normal, luego de lo cual cae rápidamente hasta llegar a un 65% de su valor inicial, aparentemente indiferente frente a la reperfusión que se permitió cuando se completaron 3 horas de isquemia.

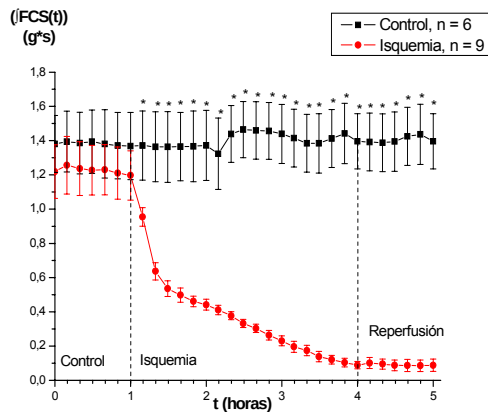
En la figura 29 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de isquemia, seguidos de 1 hora de reperfusión para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CScont.}$ luego de 1 hora de isquemia y 1 hora de reperfusión, en el B luego de 2 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión, y en el C luego de 3 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión. El comportamiento de los periodos de isquemia es muy similar al descrito arriba.

A.

B.



C.



D.

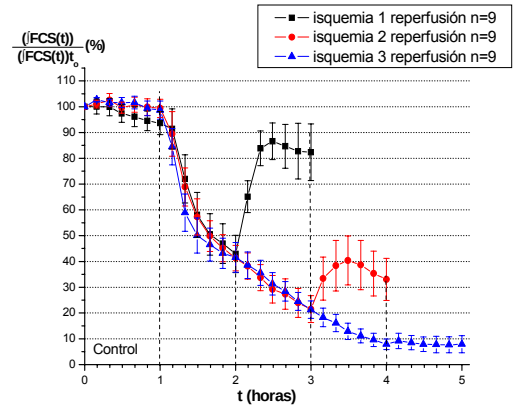
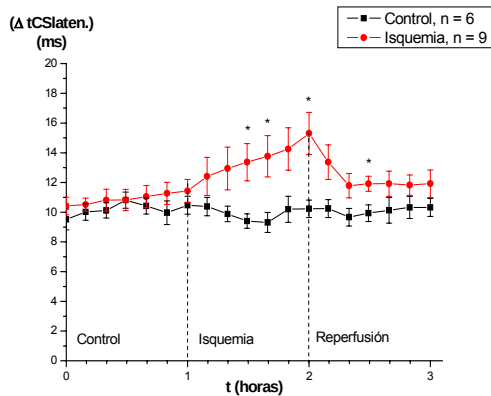


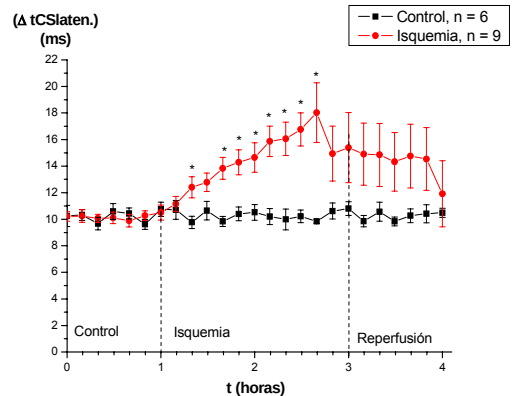
Figura 27. Integral fuerza (sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) en función del tiempo de isquemia- reperfusion para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de reperfusion (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●). D) ($\int F_{CS(t)}$) normalizada por la ($\int F_{CS(t)}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de reperfusion (■); grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●); grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

Se observa que el $\Delta t_{CScont.}$ permanece estable en los grupos control durante la isquemia y la reperfusion (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CScont.}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CScont.}$ medido a tiempo cero. Luego de 1 hora de isquemia, el $\Delta t_{CScont.}$ se recupera completamente a sus valores normales. Luego de 2 horas de isquemia el $\Delta t_{CScont.}$ ya no se recupera a sus valores normales y se observa un incremento en la varianza de los datos. Luego de 2 horas y 20 minutos de isquemia el $\Delta t_{CScont.}$ cae súbitamente, mostrando un gran aumento en la varianza de los datos, llegando a valores 70% menores que los controles y mostrándose indiferente al proceso de reperfusion.

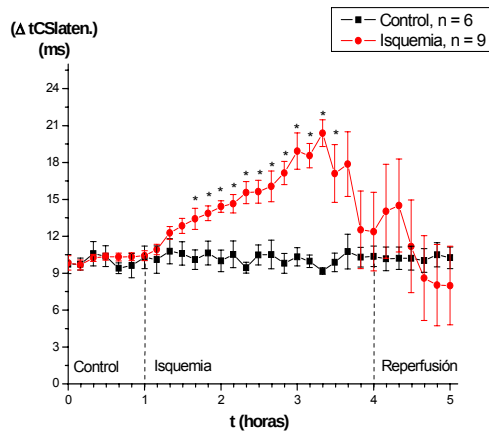
A.



B.



C.



D.

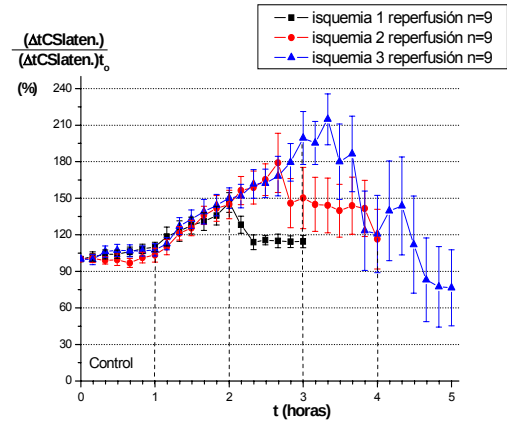
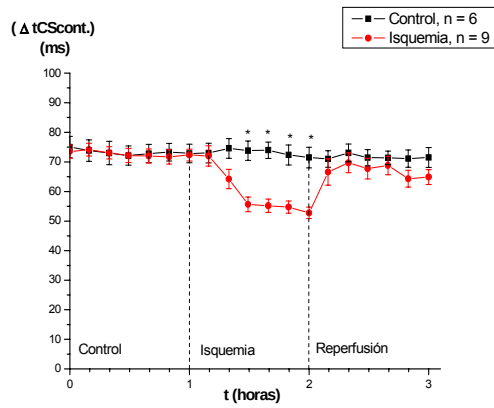


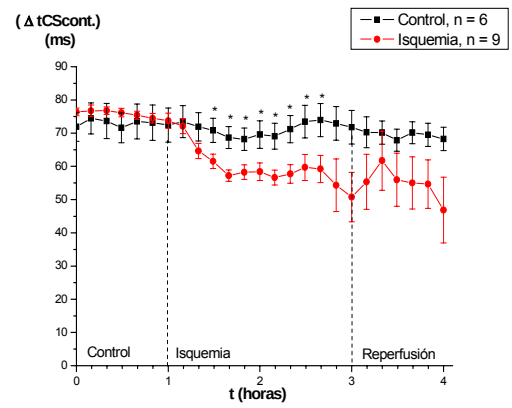
Figura 28. Tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de isquemia - reperfusión para el músculo Soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de reperfusión (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de reperfusión (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de reperfusión (●). **D)** ($\Delta t_{CSlaten.}$) normalizada por el ($\Delta t_{CSlaten.}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de reperfusión (■); grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de reperfusión (●); grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de reperfusión (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 30 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la tasa máxima de contracción $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia, seguidos de 1 hora de reperfusión para el músculo SOL. En el panel A se muestra el cambio de la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ luego de 1 hora de isquemia y 1 hora de reperfusión, en el B luego de 2 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión, y en el C luego de 3 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión. El comportamiento de los periodos de isquemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ permanece estable en los grupos control durante la isquemia y la reperfusión (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en cada punto de la curva fue normalizada con la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ medida a tiempo cero. Luego de 1 hora de isquemia, la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ se recupera 45% hasta los valores normales en 40 minutos. Después de 2 horas de isquemia, la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ se recupera 20% en los primeros 30 minutos, sin hacerlo más durante la siguiente media hora de reperfusión. Luego de 3 horas de isquemia la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ no se recupera durante 1 hora de reperfusión.

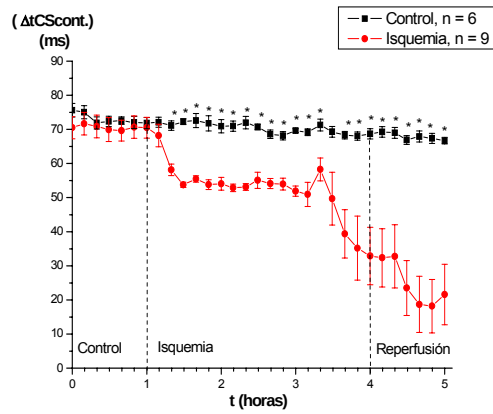
A.



B.



C.



D.

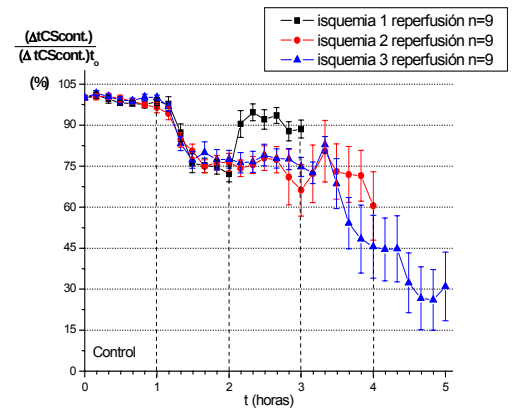
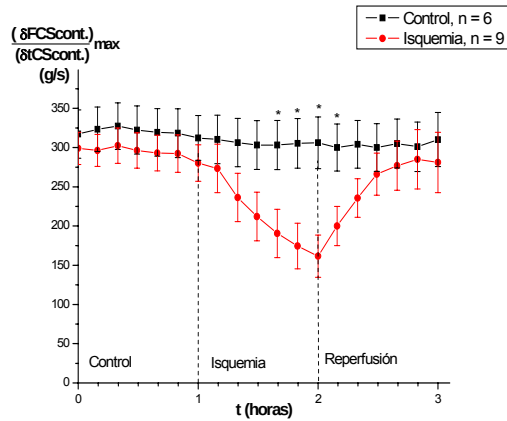


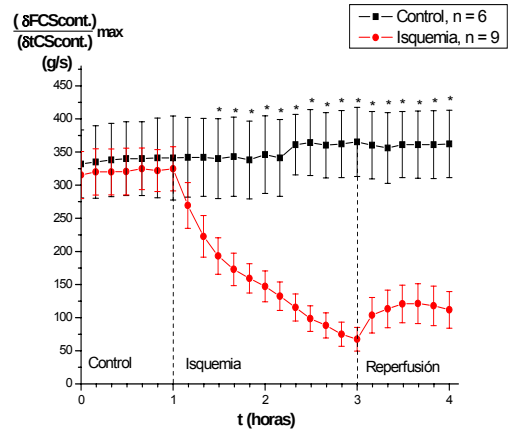
Figura 29. Tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de isquemia - reperfusion para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de reperfusion (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●). **D)** ($\Delta t_{CScont.}$) normalizado por el ($\Delta t_{CScont.}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de reperfusion (■); grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●); grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 31 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de isquemia, seguidos de 1 hora de reperfusion para el músculo SOL.

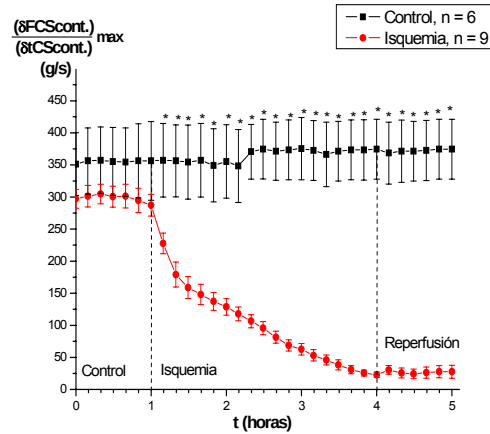
A.



B.



C.



D.

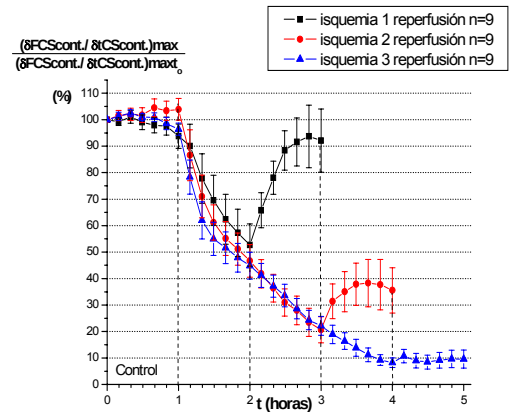
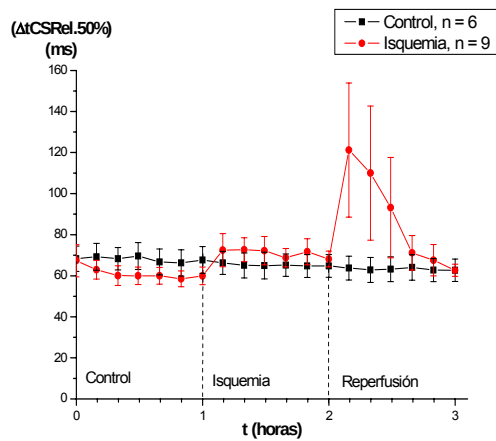


Figura 30. Tasa máxima de contracción $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de ischemia - reperusión para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperusión (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperusión (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperusión (●). **D)** $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ normalizado por la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ a tiempo cero. Grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperusión (■); grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperusión (●); grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperusión (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

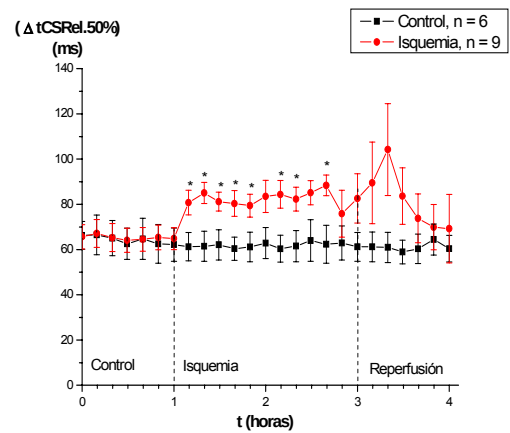
En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CSRel.50\%}$ luego de 1 hora de ischemia y 1 hora de reperusión, en el B luego de 2 horas de ischemia y 1 hora de reperusión, y en el C luego de 3 horas de ischemia y 1 hora de reperusión. El comportamiento de los periodos de ischemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ permanece estable en los grupos control durante la ischemia y la reperusión (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ medido a tiempo cero. Luego de 1 hora de ischemia, el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ a los 10 minutos se observa un incremento medio del

80% sobre el valor normal y de 60% sobre los valores observados durante la isquemia. Sin embargo, pese a la tendencia observada los resultados indican que este aumento no es significativo, posiblemente debido a la varianza aumenta que se observa. Estos incrementos de varianza lucen similares a los observados en las demás mediciones cuando los parámetros aparentan sufrir un deterioro irreversible, sugiriendo que podría haber un mecanismo común en estos cambios. Después de 2 horas de isquemia se observa un aumento similar de menor amplitud y que alcanza su pico a los 20 minutos, pero nuevamente con una gran varianza y sin significancia estadística con los grupos control. Luego de 2 horas y 20 minutos de isquemia el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ cae abruptamente hasta un 60% del valor normal, mostrando una gran variabilidad e indiferencia frente a la reperfusion que se estableció a las 3 horas de isquemia.

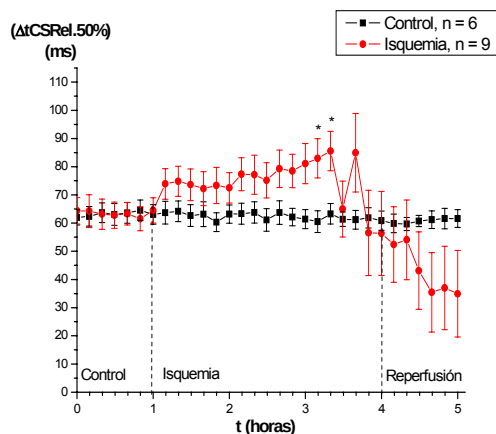
A.



B.



C.



D.

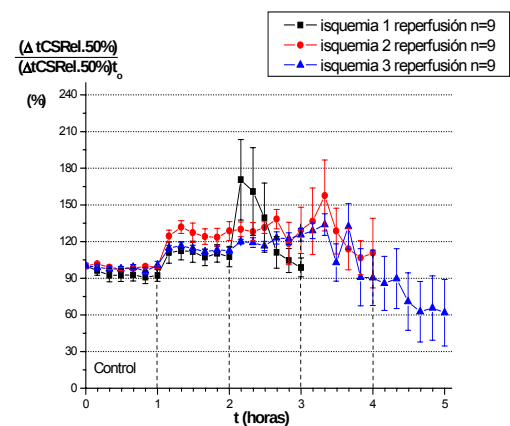
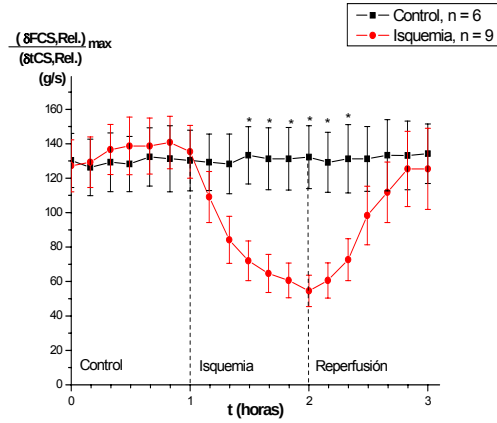


Figura 31. Tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de isquemia - reperfusion para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de reperfusion (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●). D)

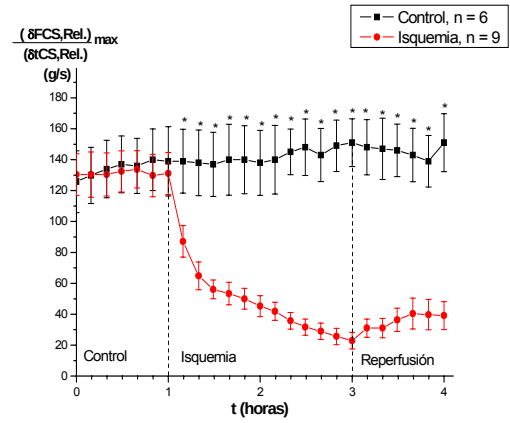
$(\Delta t_{CS,Rel.50\%})$ normalizado por el $(\Delta t_{CS,Rel.50\%})$ a tiempo cero. Grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperfusion (■); grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●); grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 32 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la tasa máxima de relajación $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en función del tiempo de ischemia, seguidos de 1 hora de reperfusion para el músculo SOL.

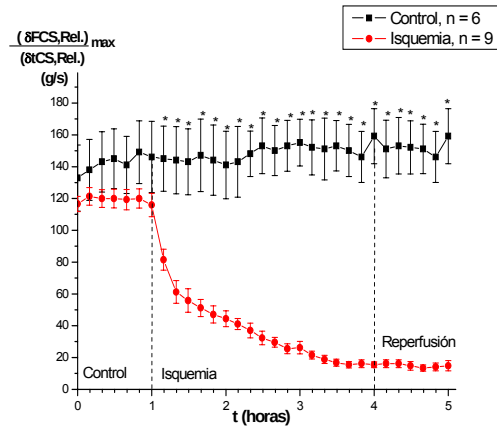
A.



B.



C.



D.

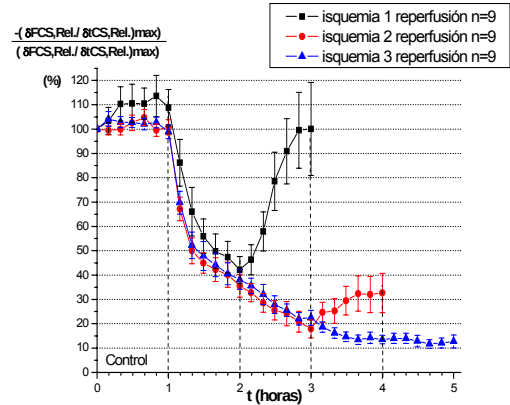


Figura 32. Tasa máxima de relajación $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en función del tiempo de ischemia - reperfusion para el músculo soleo. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperfusion (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●). **D)** $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ normalizado por el $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ a tiempo cero. Grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperfusion (■); grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●); grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En el panel A se muestra el cambio del $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ luego de 1 hora de isquemia y 1 hora de perfusión, en el B luego de 2 horas de isquemia y 1 hora de perfusión, y en el C luego de 3 horas de isquemia y 1 hora de perfusión. Todos los datos han sido multiplicados por (-1) para efectos demostrativos. El comportamiento de los periodos de isquemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que el $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ permanece estable en los grupos control durante la isquemia y la perfusión (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en cada punto de la curva fue normalizada con la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ medida a tiempo cero. Luego de 1 hora de isquemia, la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ se recupera al 100% entre los 30 y los 40 minutos. Después de 2 horas de isquemia, la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ se recupera 10% en los primeros 30 minutos, sin hacerlo más durante la siguiente media hora de perfusión. Luego de 3 horas de isquemia la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ no se recupera durante 1 hora de perfusión.

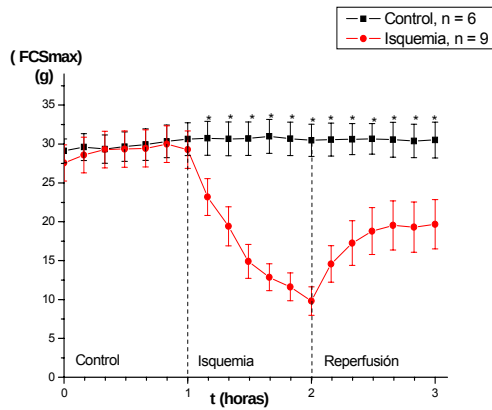
5.2.2. Músculo Extensor radial largo del carpo (ERLC):

En la figura 33 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia, seguidos de 1 hora de perfusión para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio de la ΔF_{CSmax} luego de 1 hora de isquemia y 1 hora de perfusión, en el B luego de 2 horas de isquemia y 1 hora de perfusión, y en el C luego de 3 horas de isquemia y 1 hora de perfusión. El comportamiento de los periodos de isquemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que la ΔF_{CSmax} permanece estable en los grupos control durante la isquemia y la perfusión (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la ΔF_{CSmax} en cada punto de la curva fue normalizada con la ΔF_{CSmax} medida a tiempo cero. Luego de 1 hora de isquemia, la ΔF_{CSmax} se recupera 35% en los primeros 40 minutos, sin hacerlo más durante los siguientes 20 minutos de perfusión. Después de 2 horas de isquemia, la ΔF_{CSmax} la recuperación es menor al 10% durante 1 hora de perfusión. Luego de 3 horas de isquemia la ΔF_{CSmax} no se recupera durante 1 hora de perfusión.

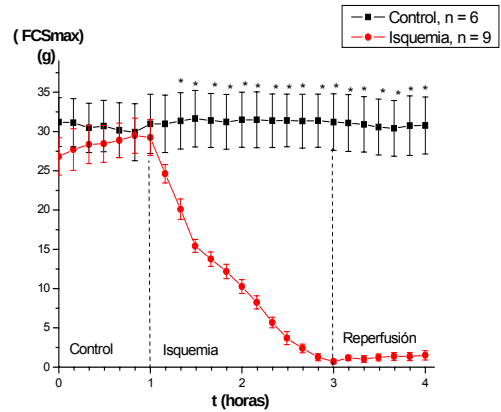
En la figura 34 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la integral fuerza_(sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) en función del tiempo de isquemia, seguidos de 1 hora de perfusión para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio de la $\int F_{CS(t)}$ luego de 1 hora de isquemia y 1 hora de perfusión, en el B luego de 2 horas de isquemia y 1 hora de perfusión, y en el C luego de 3 horas de isquemia y 1 hora de perfusión. El comportamiento de los periodos de isquemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que la $\int F_{CS(t)}$ permanece estable en los grupos control durante la isquemia y la perfusión (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $\int F_{CS(t)}$ en cada punto de la curva fue normalizada con la $\int F_{CS(t)}$ medida a tiempo cero. Luego de 1 hora

de isquemia, la ΔF_{CSmax} se recupera 50% en los primeros 30 minutos, sin hacerlo más durante los siguientes 30 minutos de perfusión. Después de 2 horas de isquemia, la $\int F_{CS(t)}$ la recuperación es menor al 10% durante 1 hora de perfusión. Luego de 3 horas de isquemia la $\int F_{CS(t)}$ no se recupera durante 1 hora de perfusión.

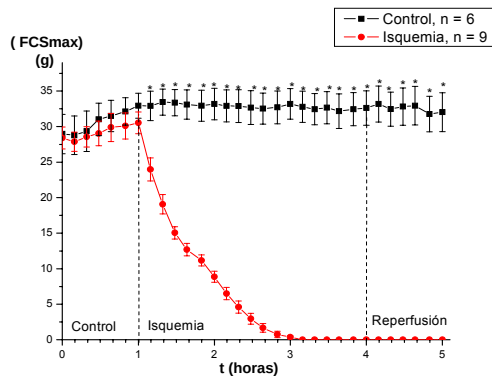
A.



B.



C.



D.

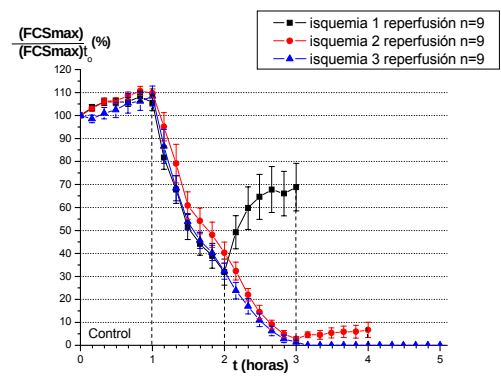
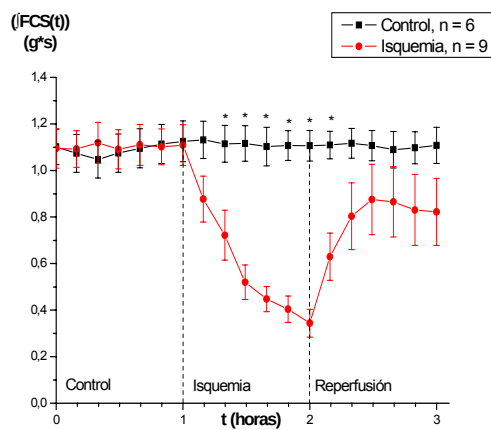


Figura 33. Fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) en función del tiempo de isquemia -reperfusión para el músculo para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de perfusión (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de perfusión (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de perfusión (●). **D)** (ΔF_{CSmax}) normalizada por la (ΔF_{CSmax}) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de perfusión (■); grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de perfusión (●); grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de perfusión (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

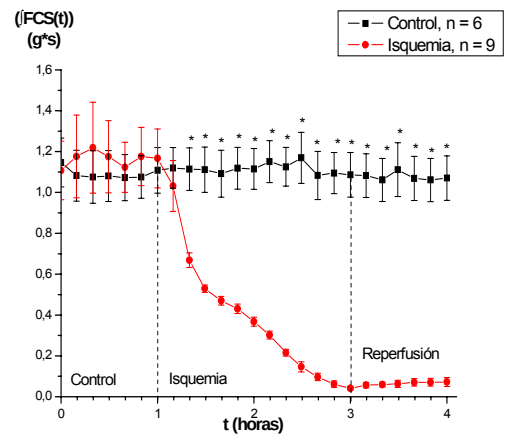
En la figura 35 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de isquemia, seguidos de 1 hora de perfusión para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CSlaten.}$ luego de 1 hora de isquemia y 1 hora de perfusión, en el B luego de 2 horas de isquemia y 1 hora de perfusión, y en el C luego de 3 horas de isquemia y 1 hora de perfusión. El comportamiento

de los periodos de isquemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que el $\Delta t_{CSlaten.}$ permanece estable en los grupos control durante la isquemia y la reperfusión (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CSlaten.}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CSlaten.}$ medido a tiempo cero. Luego de 1 hora de isquemia, el $\Delta t_{CSlaten.}$ retorna hacia sus valores normales en 20-30 minutos, pero mantiene una tendencia a permanecer ligeramente elevado, la cual no es estadísticamente significativa. Luego de 1 hora y 40 minutos el tiempo de latencia alcanza un incremento máximo de 80%, luego de lo cual cae rápidamente, mostrando un aumento en la varianza, Mientras el grupo de 2 horas de isquemia se mantuvo alrededor de los valores normales durante la reperfusión, el de 3 horas de isquemia cayó rápidamente a cero y no mostró ningún signo de recuperación durante la reperfusión.

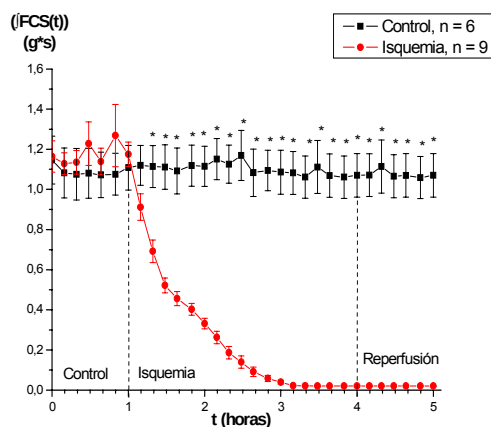
A.



B.



C.



D.

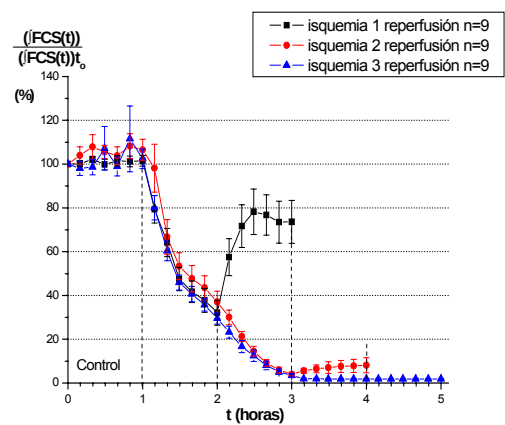
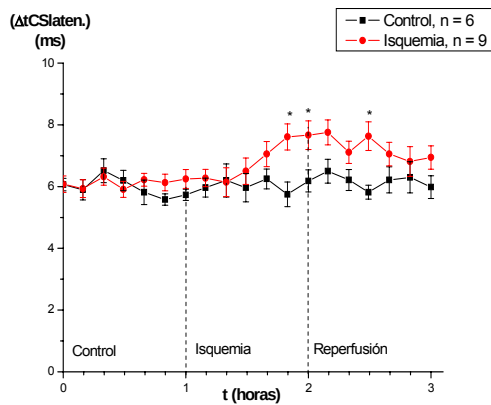


Figura 34. Integral fuerza (sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS}(t)$) en función del tiempo de isquemia - reperfusión para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de reperfusión (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de reperfusión (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de reperfusión (●).

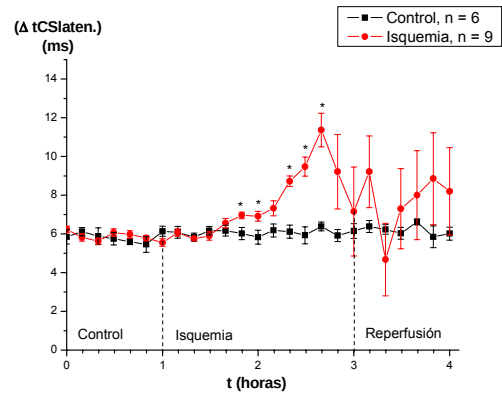
(●). **D)** ($\dot{F}_{CS(t)}$) normalizada por la ($\dot{F}_{CS(t_0)}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de perfusión (■); grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de perfusión (●); grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de perfusión (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 36 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de ischemia, seguidos de 1 hora de perfusión para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CScont.}$ luego de 1 hora de ischemia y 1 hora de perfusión, en el B luego de 2 horas de ischemia y 1 hora de perfusión, y en el C luego de 3 horas de ischemia y 1 hora de perfusión.

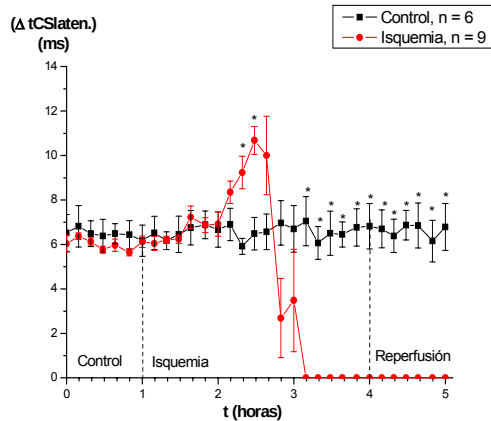
A.



B.



C.



D.

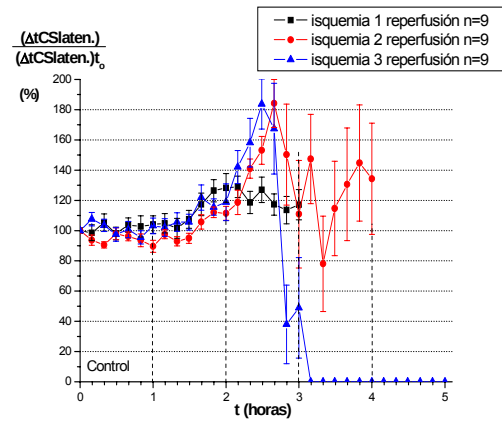
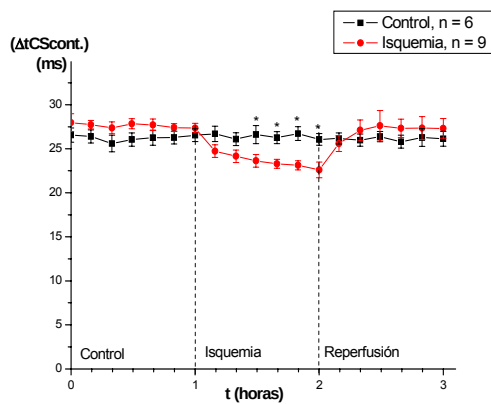


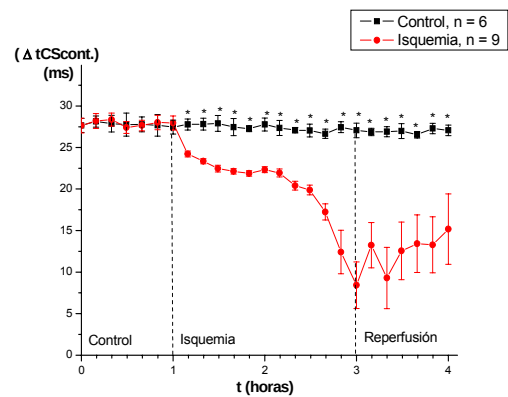
Figura 35. Tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en función del tiempo de ischemia - perfusión para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de perfusión (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de perfusión (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de perfusión (●). **D)** ($\Delta t_{CSlaten.}$) normalizado por el ($\Delta t_{CSlaten.}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de perfusión (■); grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de perfusión (●); grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de perfusión (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

El comportamiento de los periodos de ischemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que el $\Delta t_{CScont.}$ permanece estable en los grupos control durante la ischemia y la reperfusion (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CScont.}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CScont.}$ medido a tiempo cero. Luego de 10 minutos en reperfusion posterior a 1 hora de ischemia, el $\Delta t_{CScont.}$ se recupera completamente a sus valores normales. Luego de 1 hora y 10-20 minutos de ischemia el $\Delta t_{CScont.}$ cae súbitamente, mostrando un gran aumento en la varianza de los datos, llegando a una caída del 60% en el grupo de dos horas de ischemia y una caída hasta cero en el grupo de 3 horas de ischemia, sin mostrar ninguna recuperación durante la reperfusion.

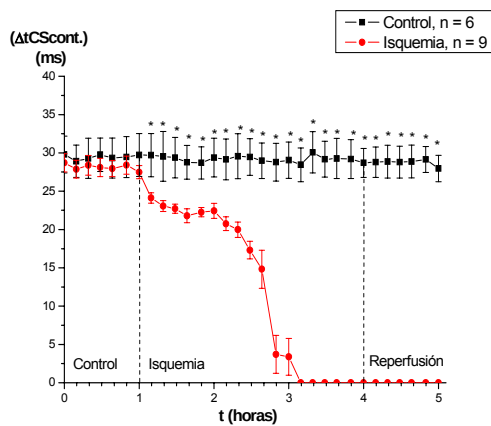
A.



B.



C.



D.

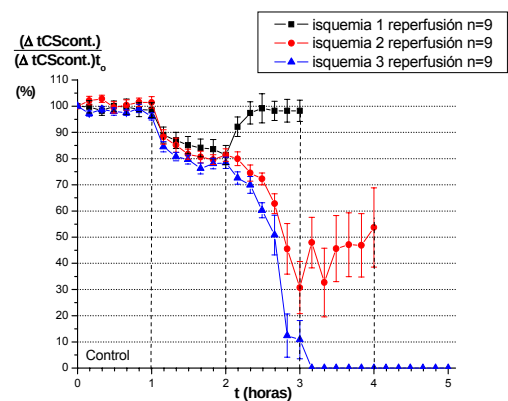
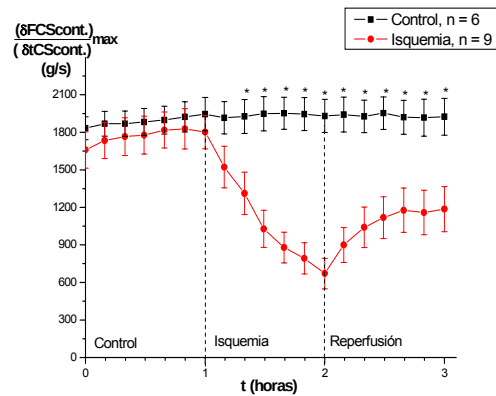


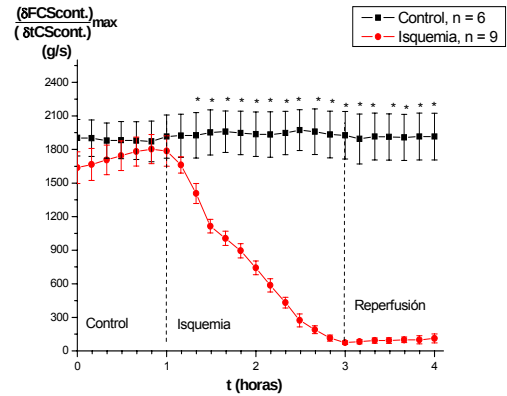
Figura 36. Tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de ischemia - reperfusion para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperfusion (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●). D) ($\Delta t_{CScont.}$) normalizado por el ($\Delta t_{CScont.}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperfusion (■); grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●); grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 37 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la tasa máxima de contracción $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de ischemia, seguidos de 1 hora de reperfusion para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio de la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ luego de 1 hora de ischemia y 1 hora de reperfusion, en el B luego de 2 horas de ischemia y 1 hora de reperfusion, y en el C luego de 3 horas de ischemia y 1 hora de reperfusion.

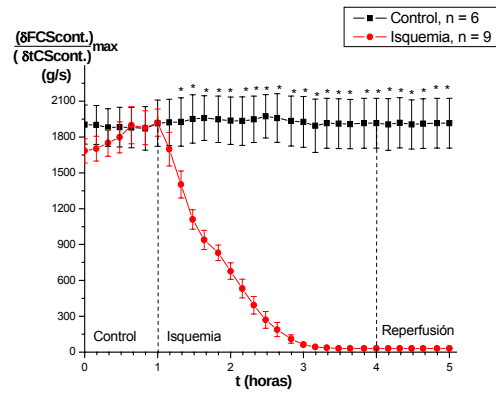
A.



B.



C.



D.

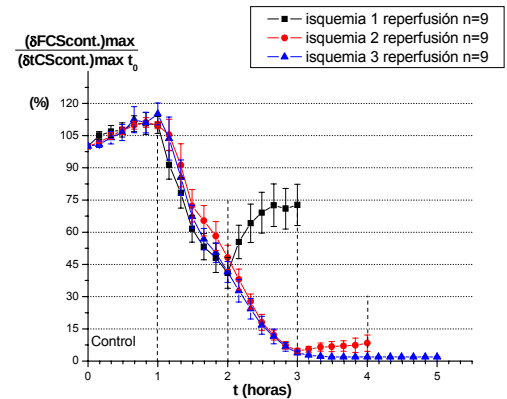
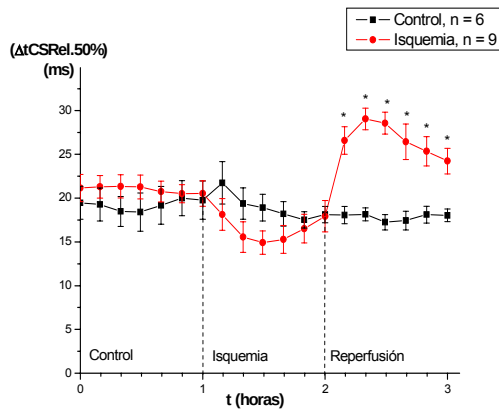


Figura 37. Tasa máxima de contracción $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de ischemia - reperfusion para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperfusion (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●). **D)** $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ normalizada por la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max} t_0$. Grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de reperfusion (■); grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (●); grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de reperfusion (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

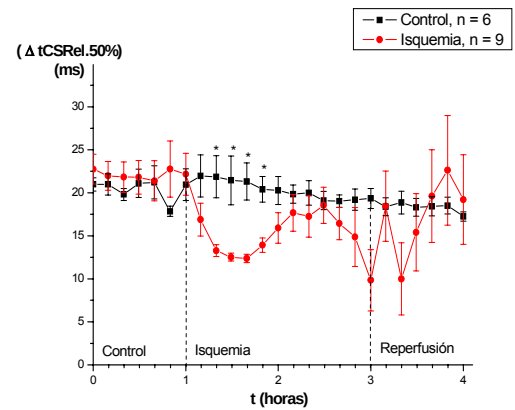
El comportamiento de los periodos de ischemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ permanece estable en los grupos control durante la ischemia y la reperfusion (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en

cada punto de la curva fue normalizada con la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ medida a tiempo cero. Luego de 1 hora de isquemia, la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ se recupera un 30% en los primeros 40 minutos, luego de lo cual no hay mas recuperación. Después de 2 horas de isquemia, la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ se recupera hasta un 10%. Luego de 3 horas de isquemia la $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ no se recupera durante 1 hora de reperfusion.

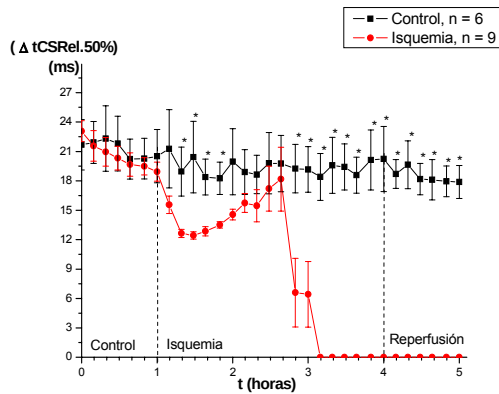
A.



B.



C.



D.

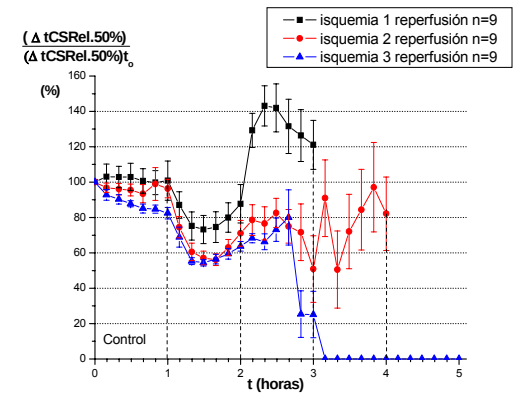
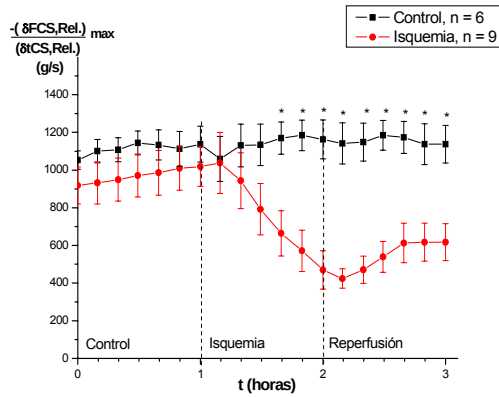


Figura 38. Tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de isquemia - reperfusion para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de reperfusion (●). B) Grupo control (■), y grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●). C) Grupo control (■), y grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●). D) ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) normalizado por el ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) a tiempo cero. Grupo a 1 hora de isquemia 1 hora de reperfusion (■); grupo a 2 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (●); grupo a 3 horas de isquemia 1 hora de reperfusion (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

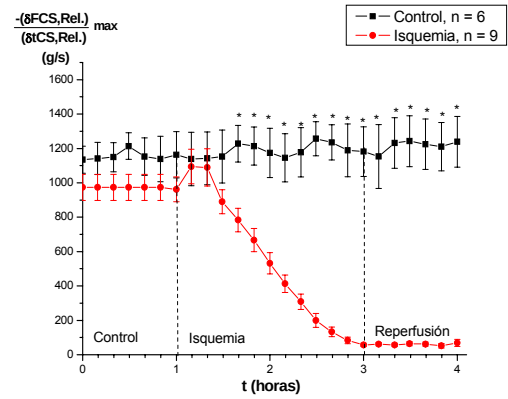
En la figura 38 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis del tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de isquemia, seguidos de 1 hora de reperfusión para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio del $\Delta t_{CSRel.50\%}$ luego de 1 hora de isquemia y 1 hora de reperfusión, en el B luego de 2 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión, y en el C luego de 3 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión. El comportamiento de los periodos de isquemia es muy similar al descrito arriba, sin embargo se ve que luego de la caída inicial, el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ se recupera durante la isquemia. Se observa que el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ permanece estable en los grupos control durante la isquemia y la reperfusión (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ en cada punto de la curva fue normalizado con el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ medido a tiempo cero. Luego de 1 hora de isquemia, el $\Delta t_{CSRel.50\%}$ a los 20 minutos en reperfusión se observa un incremento significativo del 40-50% sobre el valor normal. A partir de allí, los valores tienden a regresar a la normalidad, manteniéndose un 20% por encima del valor normal al final de la hora de reperfusión. En los otros dos grupos, luego de 1 hora y 40 minutos de isquemia, los valores son cercanos a los normales y a partir de allí se observa un aumento de la varianza en los datos. Luego de dos horas de isquemia no se ve un cambio en la reperfusión y luego de 3 horas de isquemia los valores caen rápidamente a cero, sin mostrar ninguna recuperación durante la isquemia.

En la figura 39 se observan los resultados obtenidos con la medición y el análisis de la tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) en función del tiempo de isquemia, seguidos de 1 hora de reperfusión para el músculo ERLC. En el panel A se muestra el cambio del $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ luego de 1 hora de isquemia y 1 hora de reperfusión, en el B luego de 2 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión, y en el C luego de 3 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión. Todos los datos han sido multiplicados por (-1) para efectos demostrativos. El comportamiento de los periodos de isquemia es muy similar al descrito arriba. Se observa que el $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ permanece estable en los grupos control durante la isquemia y la reperfusión (cuadrados negros). En el panel D se muestra el resumen de estos resultados, donde la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en cada punto de la curva fue normalizada con la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ medida a tiempo cero. Luego de 1 hora de isquemia, la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ se recupera un 20% en los primeros 30 minutos de la reperfusión, luego se estabiliza y al final de la hora de reperfusión se recupera al 70% del valor normal. Después de 2 y 3 horas de isquemia, la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ no se recupera durante la reperfusión, manteniéndose ligeramente superior el valor final en el grupo de 2 horas de isquemia.

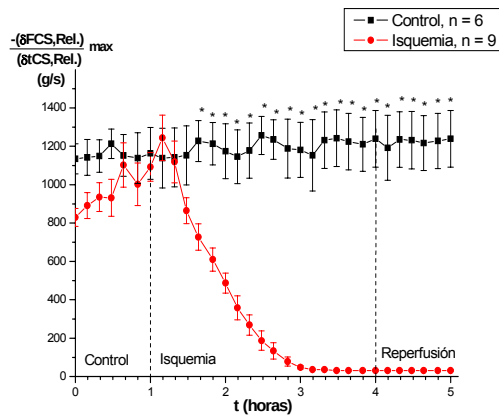
A.



B.



C.



D.

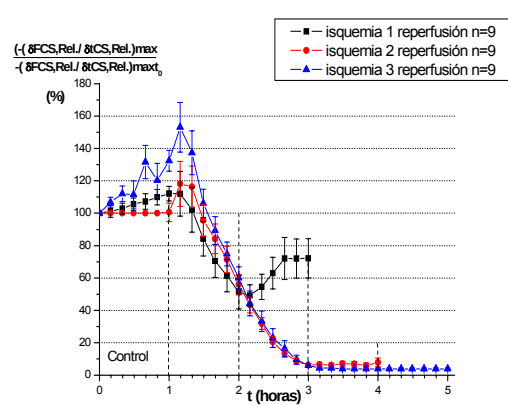


Figura 39. Tasa máxima de relajación $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ en función del tiempo de ischemia - perfusión para el músculo ERLC. A) Grupo control (■), y grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de perfusión (●). **B)** Grupo control (■), y grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de perfusión (●). **C)** Grupo control (■), y grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de perfusión (●). **D)** $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$ normalizada por la $(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max_0}$ a tiempo cero. Grupo a 1 hora de ischemia 1 hora de perfusión (■); grupo a 2 horas de ischemia 1 hora de perfusión (●); grupo a 3 horas de ischemia 1 hora de perfusión (▲). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

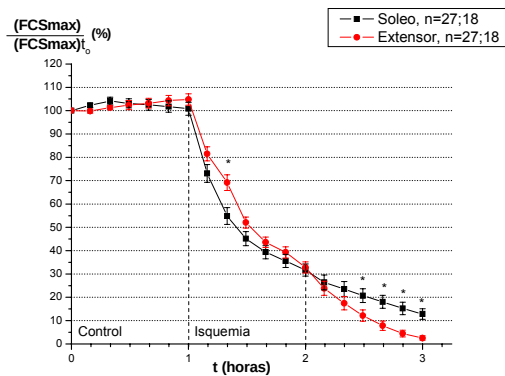
5.3. Caracterización de las diferencias significativas que presentan los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple durante ischemia y perfusión, entre el músculo SOL y el músculo ERLC.

5.3.1. Caracterización de las diferencias significativas de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple durante ischemia entre el músculo SOL y el músculo ERLC:

La figura 40 muestra el análisis comparativo de la fuerza máxima de la contracción en sacudida simple (ΔF_{CSmax}) y la Integral fuerza_(sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$), en función del tiempo de ischemia entre el músculo soleo

y el músculo ERLC. Se tomaron los datos para 1 y 2 horas de isquemia, considerando que durante la tercera de isquemia por lo general hubo un aumento en la varianza de los datos y el comportamiento de los parámetros funcionales en ambos grupos musculares luce errático, lo cual, hace difícil un análisis comparativo de esos datos. El valor de esos datos queda para contrastar este comportamiento con el que se observe en presencia de una posible terapia que mejore el desempeño observado. La figura 40 muestra que en términos de la ΔF_{CSmax} y la $\int F_{CS(t)}$ el comportamiento es muy similar cuando ambos grupos musculares son sometidos a isquemia durante 1 y 2 horas. Se observa una ligera tendencia a que ambos parámetros caigan más rápidamente en el soleo durante la primera y en el ERLC durante la segunda hora, sin embargo, estas pequeñas diferencias no son estadísticamente significativas.

A.



B.

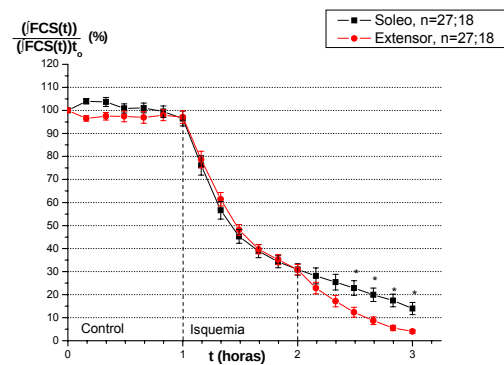


Figura 40. Comparación de la Fuerza máxima (ΔF_{CSmax}) y la Integral fuerza_(sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) normalizadas a tiempo cero en función del tiempo de isquemia entre músculo soleo y ERLC. A) comparación (ΔF_{CSmax}) entre músculo soleo a 2 horas de isquemia (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 hora de isquemia (●). B) comparación ($\int F_{CS(t)}$) entre músculo soleo a 2 horas de isquemia (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 horas de isquemia (●). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 41 compramos los valores encontrados para tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) en las primeras dos horas de isquemia en ambos grupos musculares. Se observa que el $\Delta t_{CSlaten.}$ aumenta mas rápidamente en el soleo que en el ERLC durante el tiempo registrado. Esto posiblemente se debe a que el $\Delta t_{CSlaten.}$ no cambia durante los primeros 20 minutos de isquemia en el musculo ERLC, mientras que en el soleo si aumenta. Las diferencias entre los dos grupos musculares son significativas durante la primera hora de isquemia. En la segunda hora se observa un aumento en la varianza de los datos del musculo ERLC, lo cual dificulta la comparación. A 1 hora y 30 minutos, los valores medidos caen en el ERLC, mientras que en el soleo se mantienen elevados.

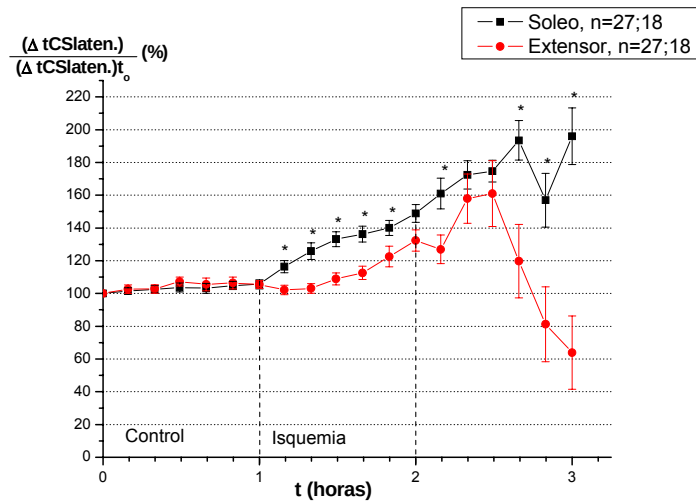
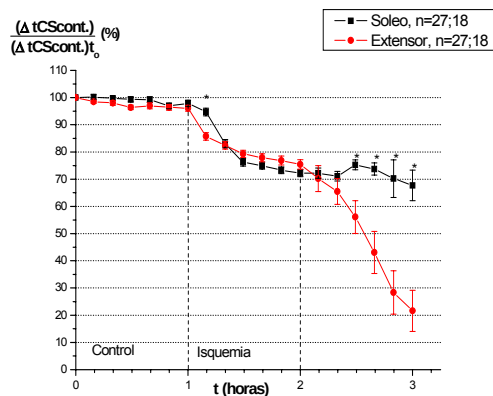


Figura 41. Comparación de tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) normalizada a tiempo cero en función del tiempo de isquemia entre músculo soleo y ERLC. A) músculo soleo a 2 horas de isquemia (■), y grupo extensor radial largo del carpo a 2 horas de isquemia (●).

En la figura 42 la comparación entre ambos grupos musculares, se establece con respecto al tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) y la tasa máxima de contracción ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.}$)_{max} en función del tiempo transcurrido en isquemia. El análisis comparativo establece que en la primera hora no hay diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros, aunque la ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.}$)_{max} en el soleo muestra una tendencia a caer más rápidamente que en el ERLC. Durante la segunda hora los dos parámetros caen más rápidamente en el ERLC, siendo más clara la diferencia en el $\Delta t_{CScont.}$.

A.



B.

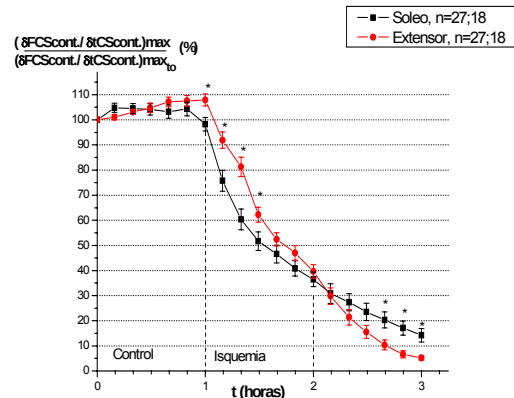
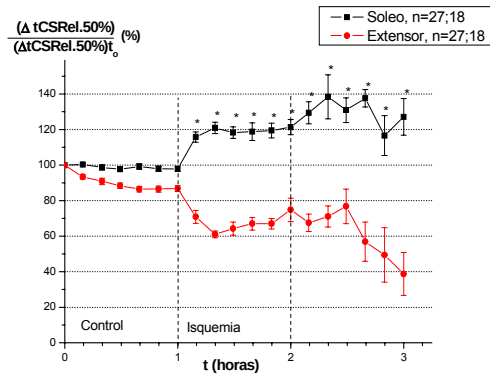


Figura 42. Comparación del Tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) y Tasa máxima de contracción ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.}$)_{max} normalizadas a tiempo cero en función del tiempo de isquemia entre músculo soleo y ERLC. A) comparación ($\Delta t_{CScont.}$) entre músculo soleo a 2 horas de isquemia (■), y grupo extensor radial largo del carpo a 2 hora de isquemia (●). B) comparación ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.}$)_{max} entre músculo soleo a 2 horas de isquemia (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 horas de isquemia (●). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 43 se muestra el análisis comparativo entre ambos grupos musculares con respecto al tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) y la tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) en función del tiempo de isquemia. En cuanto al $\Delta t_{CSRel.50\%}$, claramente los dos grupos musculares muestran un comportamiento divergente. Mientras en el soleo aumenta en el ERLC, disminuye. Esta diferencia es significativa y se mantiene desde el inicio hasta el final de las dos horas de isquemia, cuando aumenta la varianza de los datos y la caída en el ERLC tiende a profundizarse. Así mismo, en lo que respecta a la $-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$, se observa que se mantiene normal en el ERLC durante al menos 20 minutos en isquemia antes de empezar a caer, mientras que en soleo la caída se da desde el primer registro que se hace en isquemia. Igualmente, durante la primera hora de isquemia es claro que el deterioro de este parámetro es mas rápido en el soleo, pero en la segunda hora se igualan y de hecho la caída en el ERLC se hace mas rápida que en el soleo.

A.



B.

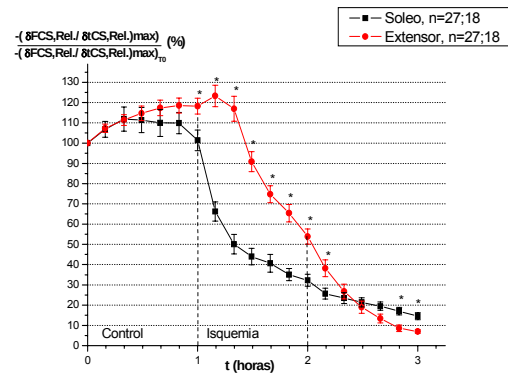


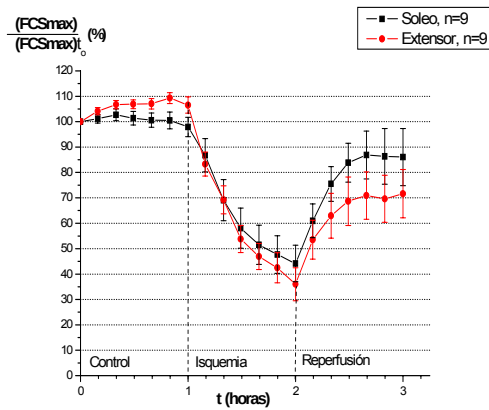
Figura 43. Comparación del tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) y tasa máxima de relajación ($-(\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) normalizadas a tiempo cero en función del tiempo de isquemia entre músculo soleo y ERLC. A) comparación ($\Delta t_{CScont.}$) entre músculo soleo a 2 horas de isquemia (■), y grupo extensor radial largo del carpo a 2 hora de isquemia (●). B) comparación ($\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ entre músculo soleo a 2 horas de isquemia (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 horas de isquemia (●). Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

5.3.2. Caracterización de las diferencias significativas de los cambios en los parámetros de la contracción en sacudida simple durante isquemia-reperfusion entre el músculo SOL y el músculo ERLC:

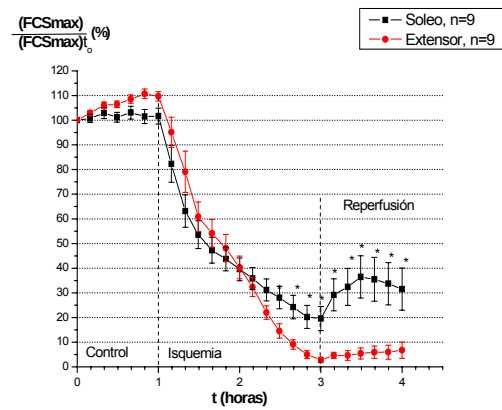
En la figuras 44 y 45 se muestra la comparación de la fuerza máxima de la contracción (ΔF_{CSmax}) y de la integral fuerza_(sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS(t)}$) en función del tiempo de isquemia y en presencia de reperfusion entre el músculo soleo y el ERLC. Ambos parámetros caen en función del tiempo de isquemia y parecen recuperarse durante la reperfusion en función del tiempo de isquemia. Luego de 1 hora de isquemia los dos musculos se recuperan parcialmente durante la reperfusion y no se observan diferencias entre ambos

grupos musculares. Luego de 2 y 3 horas de ischemia se observa que el soleo se recupera parcialmente mientras que el ERLC prácticamente no se recupera durante 1 hora de perfusión. La diferencia es significativa.

A.



B.



C.

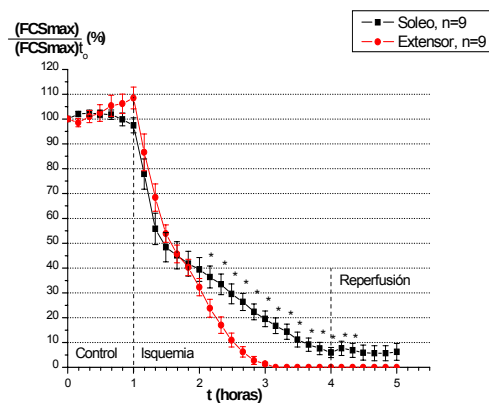
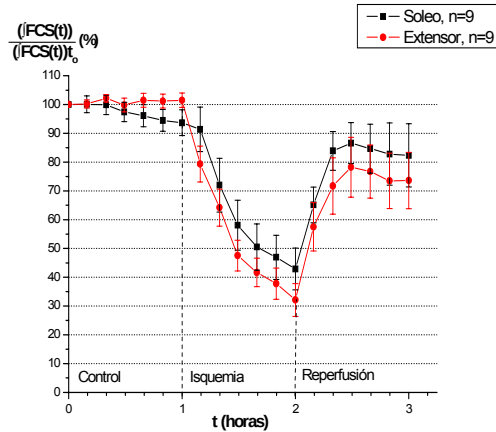


Figura 44. Comparación de la fuerza máxima de la contracción ($\Delta F_{CS_{max}}$) normalizada a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - perfusión entre músculo soleo y ERLC. A) músculo soleo a 1 hora de isquemia y 1 hora de perfusión (■), y músculo extensor a 1 hora de isquemia y 1 hora de perfusión (●). B) músculo soleo a 2 horas de isquemia y una 1 hora de perfusión (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 horas de isquemia y una hora de perfusión (●). C) músculo soleo a 3 horas de isquemia y una 1 hora de perfusión (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 3 horas de isquemia y una hora de perfusión. Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

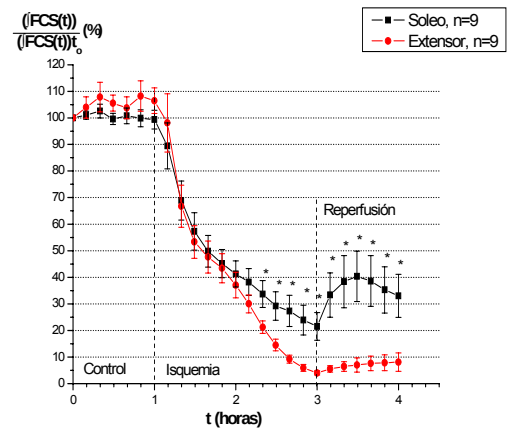
En la figura 46 se observa la comparación de tiempo de latencia ($\Delta t_{CS_{laten.}}$) en función del tiempo de isquemia y en presencia de perfusión entre músculo soleo y el músculo ERLC. En ambos musculos se observa que el $\Delta t_{CS_{laten.}}$ aumenta durante la isquemia. El musculo ERLC se mantiene en sus valores normales por al menos 20 minutos luego de iniciada la isquemia, mientras que el soleo cambia desde el primer registro. Una vez aumentan, el incremento es paralelo en ambos musculos. Luego de 1 hora de isquemia ambos musculos se recuperan durante la perfusion con un curso temporal similar. Luego de dos horas de isquemia el soleo se recupera parcialmente, mientras que los datos del ERLC muestran un incremento en la varianza y un comportamiento errático. El ERLC para soportar adecuadamente 1 hora 40-50 minutos en isquemia,

mientras que la resistencia del soleo parece ser de 2 horas y 30 minutos, tiempo después del cual este parámetro parece sufrir un deterioro en ambos músculos.

A.



B.



C.

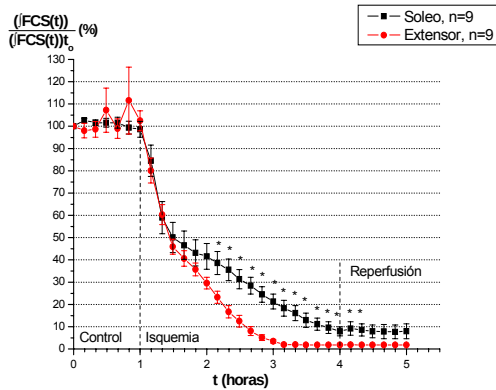
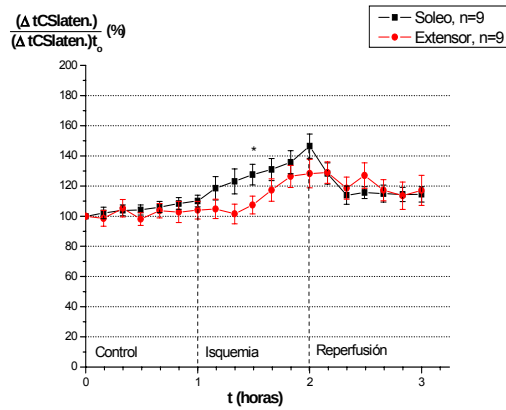


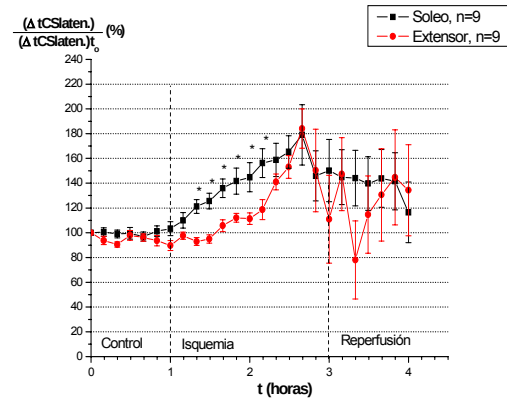
Figura 45. Comparación de la Integral fuerza_(sacudida-simple)-tiempo (rendimiento) ($\int F_{CS}(t)$) normalizadas a tiempo cero en función del tiempo de ischemia - reperfusion entre músculo soleo y ERLC. A) músculo soleo a 1 horas de ischemia y 1 hora de reperfusion (■), y músculo extensor a 1 hora de ischemia y 1 hora de reperfusion (●). B) músculo soleo a 2 horas de ischemia y una 1 hora de reperfusion (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 horas de ischemia y una hora de reperfusion (●). C) músculo soleo a 3 horas de ischemia y una 1 hora de reperfusion (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 3 horas de ischemia y una hora de reperfusion. Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 47 se muestra la comparación del tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) en función del tiempo de ischemia y en presencia de reperfusion entre el músculo soleo y el ERLC. Luego de 1 hora de ischemia ambos musculos se recupera a sus valores normales con un curso temporal similar. Luego de dos horas de ischemia ninguno de los dos musculos se recupera y los datos muestran un incremento en la varianza para ambos casos. Este parámetro parece deteriorarse en ambos musculos antes de completar las tres horas de ischemia y no observan cambios aparentes durante la reperfusion.

A.



B.



C.

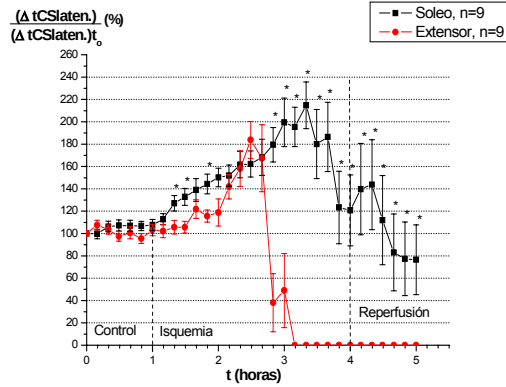
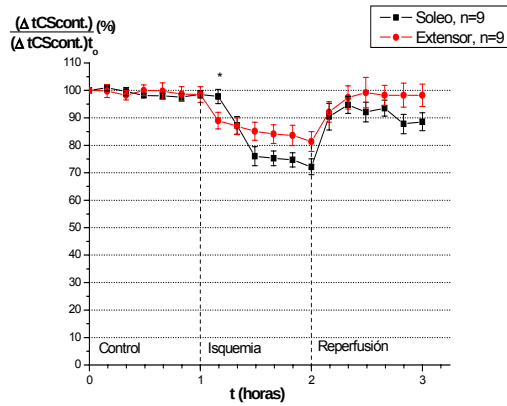


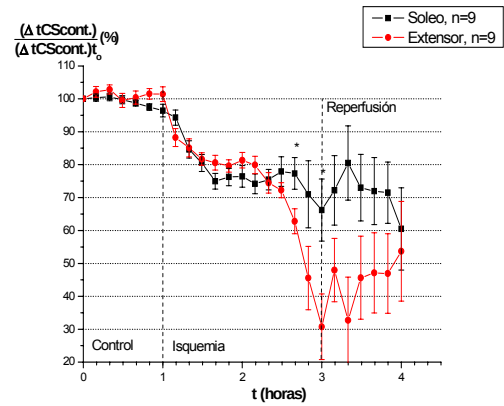
Figura 46. Comparación de tiempo de latencia ($\Delta t_{CSlaten.}$) normalizado a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - reperfusion entre músculo soleo y extensor radial largo del carpo. A) músculo soleo a 1 horas de isquemia y 1 hora de reperfusion (■), y músculo extensor a 1 hora de isquemia y 1 hora de reperfusion (●). B) músculo soleo a 2 horas de isquemia y una 1 hora de reperfusion (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 horas de isquemia y una hora de reperfusion (●). C) músculo soleo a 3 horas de isquemia y una 1 hora de reperfusion (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 3 horas de isquemia y una hora de reperfusion. Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 48 se muestra la comparación de la tasa máxima de contracción $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ en función del tiempo de isquemia y en presencia de reperfusion entre el músculo soleo y el ERLC. Ambos parámetros caen en función del tiempo de isquemia y parecen recuperarse durante la reperfusion en función del tiempo de isquemia. Luego de 1 hora de isquemia ambos grupos se recuperan parcialmente y no se observan diferencias entre ambos grupos musculares. Luego de 2 y 3 horas de isquemia se observa que el soleo se recupera parcialmente mientras que el ERLC prácticamente no se recupera durante 1 hora de reperfusion. La diferencia es significativa.

A.



B.



C.

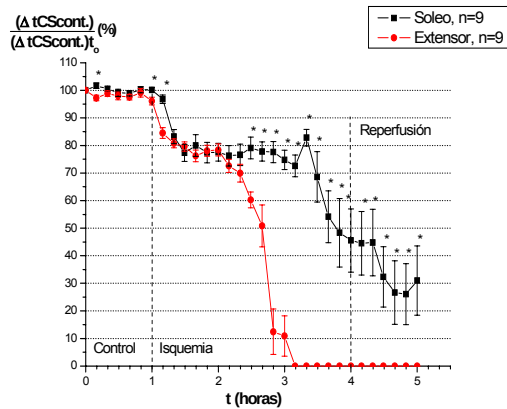
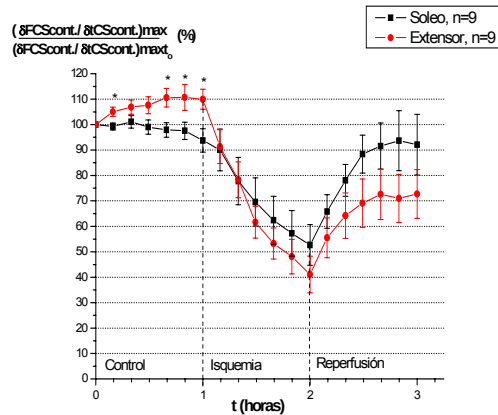


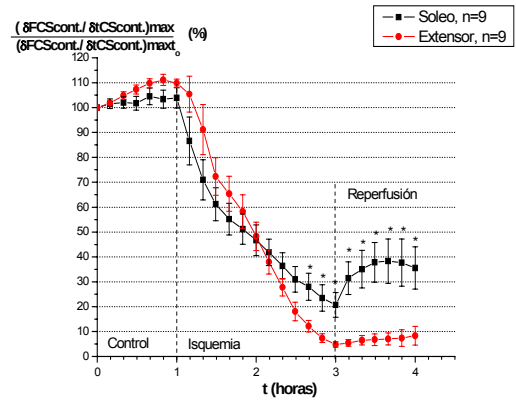
Figura 47. Comparación del tiempo de contracción ($\Delta t_{CScont.}$) normalizado a tiempo cero en función del tiempo de ischemia - reperfusion entre músculo soleo y ERLC. A) músculo soleo a 1 horas de ischemia y 1 hora de reperfusion (■), y músculo extensor a 1 hora de ischemia y 1 hora de reperfusion (●). B) músculo soleo a 2 horas de ischemia y una 1 hora de reperfusion (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 horas de ischemia y una hora de reperfusion (●). C) músculo soleo a 3 horas de ischemia y una 1 hora de reperfusion (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 3 horas de ischemia y una hora de reperfusion. Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 49 se muestra la comparación del tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) en función del tiempo de ischemia y en presencia de reperfusion entre el músculo soleo y el ERLC. Nuevamente los dos grupos musculares muestran un comportamiento divergente durante la isquemia. Mientras en el soleo aumenta en el ERLC, disminuye. Esta diferencia es significativa y se mantiene desde el inicio hasta el final de las dos horas de isquemia, cuando aumenta la varianza de los datos y la caída en el ERLC tiende a profundizarse. Luego de 1 hora de isquemia en ambos grupos musculares se ve un incremento súbito de este $\Delta t_{CSRel.50\%}$. El cambio muestra un curso temporal similar, pero sube y desciende más rápido en el musculo soleo que en el ERLC. Este cambio característico no se observa luego de 2 y de 3 horas de isquemia en ninguno de los grupos musculares. De hecho luego de estos tiempos de isquemia no se observa recuperación y más bien un incremento en la varianza de los datos.

A.



B.



C.

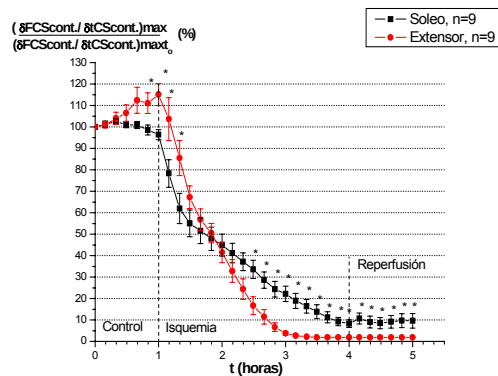
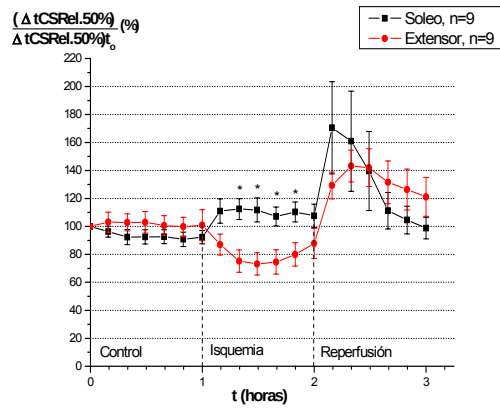


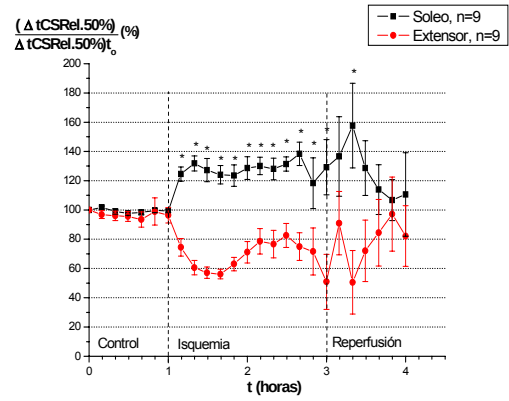
Figura 48. Comparación de la tasa máxima de contracción $(\delta F_{CScont.}/\delta t_{CScont.})_{max}$ normalizada a tiempo cero en función del tiempo de ischemia - perfusión entre músculo soleo y extensor radial largo del carpo. A) músculo soleo a 1 horas de ischemia y 1 hora de perfusión (■), y músculo extensor a 1 hora de ischemia y 1 hora de perfusión (●). B) músculo soleo a 2 horas de ischemia y una 1 hora de perfusión (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 horas de ischemia y una hora de perfusión (●). C) músculo soleo a 3 horas de ischemia y una 1 hora de perfusión (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 3 horas de ischemia y una hora de perfusión. Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

En la figura 50 se muestra la comparación tasa máxima de relajación ($(-\delta F_{CS,Rel.}/\delta t_{CS,Rel.})_{max}$) en función del tiempo de ischemia y en presencia de perfusión entre el músculo soleo y el ERLC. El comportamiento durante la isquemia es similar al descrito arriba. Luego de 1 hora de isquemia ambos grupos se recuperan parcialmente y no se observan diferencias significativas entre ambos grupos musculares. Luego de 2 y 3 horas de isquemia se observa que el soleo se recupera parcialmente mientras que el ERLC prácticamente no se recupera durante 1 hora de perfusión. La diferencia es significativa.

A.



B.



C.

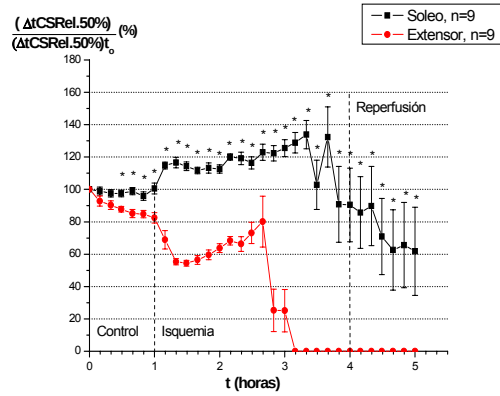
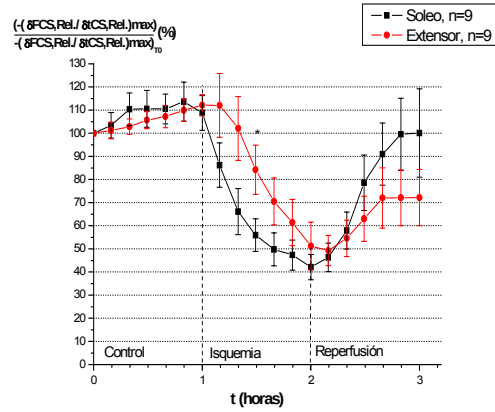
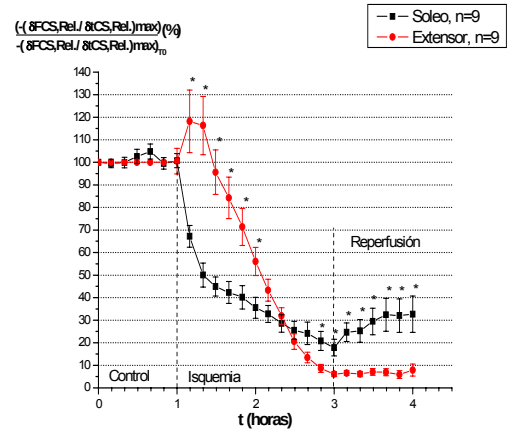


Figura 49. Comparación de tiempo medio de relajación ($\Delta t_{CSRel.50\%}$) normalizado a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - reperusión entre músculo soleo y extensor radial largo del carpo. A) músculo soleo a 1 horas de isquemia y 1 hora de reperusión (■), y músculo extensor a 1 hora de isquemia y 1 hora de reperusión (●). B) músculo soleo a 2 horas de isquemia y una 1 hora de reperusión (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 horas de isquemia y una hora de reperusión (●). C) músculo soleo a 3 horas de isquemia y una 1 hora de reperusión (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 3 horas de isquemia y una hora de reperusión. Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

A.



B.



C.

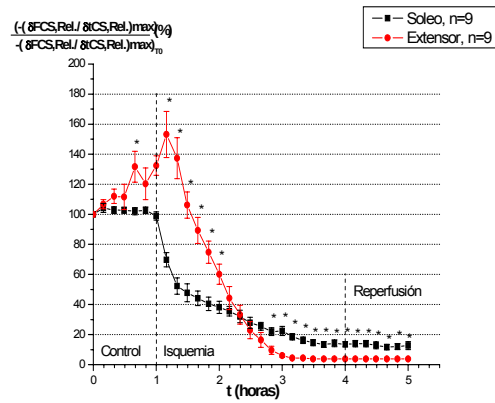


Figura 50. Comparación de la tasa máxima de relajación $\frac{-(\delta F_{CS,Rel}/\delta t_{CS,Rel})_{max}}{-(\delta F_{CS,Rel}/\delta t_{CS,Rel})_{max}_0}$ normalizada a tiempo cero en función del tiempo de isquemia - reperusión entre músculo soleo y extensor radial largo del carpo A) músculo soleo a 1 horas de isquemia y 1 hora de reperusión (■), y músculo extensor a 1 hora de isquemia y 1 hora de reperusión (●). B) músculo soleo a 2 horas de isquemia y una 1 hora de reperusión (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 2 horas de isquemia y una hora de reperusión (●). C) músculo soleo a 3 horas de isquemia y una 1 hora de reperusión (■), y músculo extensor radial largo del carpo a 3 horas de isquemia y una hora de reperusión. Los valores corresponden a las medias $\pm$ s.e.m. El asterisco indica la significancia estadística (t de Student, $p < 0.05$).

6. DISCUSION.

6.1. Modelo in-vivo del traumatismo isquemia-reperfusión en el músculo esquelético:

La implementación de un modelo in-vivo en ratas del traumatismo del músculo esquelético secundario a isquemia-reperfusión es de gran utilidad para evaluar las terapias que puedan contribuir a prevenir y minimizar las lesiones, el dolor y la limitación funcional observadas durante este proceso (Gürke, et al., 2000). Debido a ésto, hemos adelantado un estudio de investigación basado en experimentación con animales con el objeto de caracterizar los cambios que se presentan en la función contráctil en sacudida simple durante isquemia y perfusión en el músculo soleo (SOL) (oxidativo) y el músculo extensor radial largo del carpo (ERLC) (glicolítico) de ratas adultas. Igualmente, hemos caracterizado las diferencias observadas en esos cambios entre ambos grupos musculares. Los modelos in-vivo tienen la ventaja de que todos los mecanismos fisiológicos están presentes, se pueden evaluar efectos centrales y periféricos, y se puede hacer estimulación para simular efectos fisiológicos. Las desventajas de este modelo estriban en que los músculos normalmente son mezclas de distintos tipos de fibras, son modelos más complejos que producen resultados interrelacionados, por lo cual es más difícil definir mecanismos de acción (Allen, Lamb & Westerblad, 2008).

La función contráctil del músculo esquelético en sacudida simple durante isquemia y perfusión se ha estudiado previamente (Fish *et al.*, 1989; Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998), pero no se ha caracterizado de forma completa. En particular, parámetros de la sacudida simple tales como el tiempo de latencia, la tasa máxima de relajación y la integral fuerza_(contracción)-tiempo (rendimiento) no habían sido evaluados hasta nuestro estudio. De otra parte, parámetros de la sacudida simple tales como el tiempo de contracción, el tiempo medio de relajación y la tasa máxima de contracción habían sido evaluados cada hora (Fish *et al.*, 1989; Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998), perdiendo información valiosa acerca de su comportamiento durante las primeras dos horas de isquemia-reperfusión, tiempo en el cual sugieren nuestros resultados, es más recomendable una intervención que pretenda contener o minimizar los daños musculares inducidos por la isquemia-reperfusión.

Nuestros resultados indican que la función contráctil del músculo SOL se ve comprometida más rápidamente que la del músculo ERLC durante la primera hora de isquemia absoluta. Previamente, se había encontrado que la caída en la fuerza máxima es mayor en los primeros 45 minutos de isquemia en el músculo SOL (oxidativo) con respecto al músculo extensor largo de los dedos (EDL) (glicolítico) (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). Nuestros resultados muestran un efecto similar, pero menos marcado durante los primeros 30 minutos de isquemia. En nuestro caso, la fuerza máxima cae en ambos músculos en un 70% durante la

primera hora de isquemia. Una posible explicación para esta diferencia puede ser que en cada caso se utilizó un músculo diferente como modelo de músculo glicolítico. Nosotros empleamos el ERLC, el cual es parte del miembro anterior del animal, mientras que el EDL, utilizado en estudios previos, es parte del miembro posterior del animal. En este sentido existe evidencia experimental que indica que el tipo de fibra muscular no permitiría predecir la sensibilidad al daño inducido por isquemia-reperfusión (Sternbergh & Adelman, 1992). Esta evidencia, si bien no invalida la implementación de este modelo in-vivo, indica que no es posible generalizar los resultados obtenidos a otros grupos musculares en función del tipo de fibras que ellos contengan.

De otro lado, en nuestro modelo experimental la estimulación para inducir la sacudida simple de los músculos se hizo cada 10 minutos, mientras que en modelos previos la estimulación se había hecho como máximo cada 15 minutos. (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). Nuestro protocolo podría afectar los resultados si al incrementar la frecuencia de estimulación se aumentara la tasa de caída de las fuentes energéticas del músculo. Sin embargo, consideramos que el impacto de esta mayor frecuencia de estimulación sería mínimo, tomando en cuenta que en los estudios previos se encontró una caída del ATP menor al 30% durante la primera hora de isquemia en ambos grupos musculares, luego de inducir en ellos una sacudida simple cada 15 minutos y adicionalmente una contracción tetánica durante 500 ms (Carvalho, McKee & Green, 1996). Es probable que la caída en la concentración de ATP se deba más a la contracción tetánica que a las sacudidas simples que le antecedieron. Sin embargo, en este sentido, sería interesante en el futuro observar el comportamiento de los parámetros de la contracción en sacudida simple de ambos grupos musculares durante isquemia-reperfusión, si la estimulación se hiciera cada 5 minutos o cada minuto. Estos protocolos permitirían evaluar el efecto del aumento de la frecuencia de estimulación en este rango y al mismo tiempo obtener un curso temporal más detallado de los cambios que inducen la isquemia-reperfusión en los parámetros de la contracción muscular en sacudida simple.

En estudios previos y en nuestro estudio, también se observa que los músculos que contienen fibras glicolíticas son menos resistentes a tiempos de isquemia superiores a 1 hora (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997). Luego de 1 hora de isquemia, si bien la caída en la fuerza máxima en ambos grupos musculares es menor (20 a 30%), el efecto de la isquemia sobre la fuerza máxima de contracción parece ser mayor en el músculo EDL que en el músculo SOL (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). De otro lado, los estudios previos y nuestro estudio, indican que ambos grupos musculares se recuperan durante la perfusión, siendo mayor la recuperación entre menor sea el tiempo de la isquemia. Se observa que la recuperación durante la primera hora de perfusión es mayor en el músculo SOL que en el EDL (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). En los estudios previos y en el nuestro también se observa

que la fuerza máxima disminuye en la medida que aumenta el tiempo de isquemia y luego de 2 horas en esta condición la recuperación durante la primera hora de reperfusión es apenas cercana al 10% (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). Finalmente, en los estudios previos y en el nuestro se observa que luego de 3 horas de isquemia, la fuerza máxima de contracción en sacudida simple cae a niveles cercanos a cero y que la misma no se recupera durante 1 hora de reperfusión en ninguno de los dos grupos musculares (Carvalho, McKee & Green, 1997).

En estudios previos también se han reportado caídas importantes de la tasa máxima de contracción en sacudida simple en función del tiempo de isquemia (Fish *et al.*, 1989), sin embargo, hasta ahora nada se ha publicado sobre el comportamiento de este parámetro durante la reperfusión. En este estudio reportamos por primera vez como es el curso temporal de la recuperación de la tasa máxima de contracción durante la reperfusión luego de 1, 2 y 3 horas de isquemia. Así mismo, los estudios previos ofrecían datos parciales y contradictorios con respecto al comportamiento del tiempo de contracción y del tiempo medio de relajación durante la isquemia (Carvalho, McKee & Green, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998). En este estudio por primera vez detallamos el comportamiento de estos dos parámetros durante 1, 2 y 3 horas de isquemia absoluta y su recuperación durante una hora de reperfusión. Finalmente, es este estudio por primera vez, estamos reportando el comportamiento durante isquemia-reperfusión del tiempo de latencia, la tasa máxima de relajación y la integral fuerza_(contracción)-tiempo (rendimiento).

La caracterización de los cambios que sufren estos parámetros de la contracción en sacudida simple en ambos grupos musculares, es un punto de partida necesario para evaluar las intervenciones farmacológicas y terapéuticas que se propongan para modificar su comportamiento, buscando prevenir los efectos lesivos de la isquemia-reperfusión en el músculo esquelético. De otro lado, si bien los modelos in-vivo no son óptimos para estudiar los mecanismos responsables de los cambios observados, considerando los avances que se han hecho en las dos últimas décadas en el entendimiento del fenómeno de la contracción muscular (Cheng & Lederer, 2008; Allen, Lamb & Westerblad, 2008; Endo, 2009), es posible considerar cuáles podrían ser los mecanismos más probables que permitieran explicar los cambios observados en el modelo in-vivo en ambos grupos musculares durante isquemia-reperfusión. Estas explicaciones ayudarían a identificar posibles blancos terapéuticos y de esa forma a guiar futuros experimentos para el ensayo de terapias que puedan contener o minimizar los daños musculares inducidos por la isquemia-reperfusión. Una alternativa más recomendable aun, es emprender la construcción de modelos matemáticos que permitan reproducir estos resultados experimentales, ensayar otras condiciones experimentales y anticipar los posibles efectos de las terapias a ensayar. Parte de nuestro esfuerzo experimental futuro se orientará en esta dirección.

6.2. Efectos metabólicos durante isquemia sobre el acoplamiento excitación-contracción:

En acuerdo a estudios previos se ha determinado que los cambios metabólicos más relevantes que podemos esperar en nuestro modelo de isquemia están asociados a una caída en las reservas energéticas y a las adaptaciones de las fibras musculares para mantener estas reservas (Carvalho, McKee & Green, 1996). Los resultados sugieren que una vez comienza la isquemia absoluta, la consecuente anoxia muscular que se presenta, incrementa el metabolismo anaeróbico en los dos grupos musculares. Pese a no existir alta actividad contráctil, los músculos empezarán a consumir su ATP, para mantener en funcionamiento las bombas iónicas y el tono muscular. La disminución de las reservas de ATP incrementa la actividad de la creatina fosfoquinasa (CPK). Así, inicialmente el ATP se repone a partir de la PCr, cuyos depósitos a su vez comienzan a agotarse rápidamente en la medida que se va renovando el ATP. Una vez se agotan las reservas de PCr, la célula utiliza el glucógeno almacenado, convirtiéndolo en glucosa 1 fosfato y de allí en piruvato a través de la glicolisis. Luego de consumir todo el glucógeno almacenado en la fibra muscular, la concentración de ATP finalmente comenzará a caer. En nuestro caso y a partir de reportes previos (Carvalho, McKee & Green, 1996), concluimos que una caída importante en la concentración de ATP ocurrirá durante la tercera hora de isquemia, lo cual redundará en una pérdida de la función contráctil y en una alteración global de todos los parámetros de la sacudida simple. En la tercera hora de isquemia las concentraciones de ATP que hay en ambos músculos (200 a 300 μM) son insuficientes para sostener actividad alguna en las bombas iónicas, por lo cual los gradientes de Na^+ y K^+ tenderán a desaparecer y las fibras musculares se llenarán de Ca^{2+} , el cual activará proteasas, fosfolipasas y calpainas que pueden inducir procesos de muerte celular. A esta altura las células tenderán a llenarse de Na^+ y Cl^- , lo cual las despolarizará, bloqueando la conducción nerviosa y las edematizará por el efecto osmótico de estos dos iones.

Como se ha anotado, durante la primera hora de isquemia absoluta las reservas de ATP caen hasta un 20 y 30%, en el EDL y el SOL, respectivamente (Carvalho, McKee & Green, 1996). La concentración de ATP remanente luego de 1 hora de isquemia ($> 3,5 \text{ mM}$) es suficiente para sostener la actividad de las bombas iónicas y la actividad contráctil del músculo (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). De esta forma, concluimos que los efectos observados durante la primera hora de isquemia no pueden ser atribuidos a la disminución de las reservas de ATP. Igualmente, se ha reportado que durante las 3 horas de isquemia hay una despolarización del potencial de reposo del sarcolema hasta -60 mV (Jennische, Hagberg & Haljamäe, 1982). Esta despolarización tampoco afectaría negativamente a ninguno de los dos grupos musculares y más bien aumentaría su excitabilidad, al requerirse menos corriente de sodio para inducir el potencial de acción en el sarcolema, sin embargo no podemos descartar cierto nivel de inactivación de los Na_v y de los DHPR. Finalmente, los niveles de ADP, no aumentan mas allá de los 20 μM , debido a que los nucleótidos totales empiezan a formar IMP y por esa vía hipoxantina hasta

llegar a ácido úrico, marcando el inicio del agotamiento de las reservas de nucleótidos totales del músculo. Así, no se esperarían efectos negativos del ADP en esas condiciones. El agotamiento de las reservas de nucleótidos, la incapacidad de las células para reponerlas por daño mitocondrial irreversible y el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular dejarían la célula en un punto de no retorno y sellarían su destino hacia una muerte segura.

La disminución de los niveles de PCr, el mantenimiento de los niveles de ATP con la glicolisis y el consumo del ATP para mantener activas las bombas iónicas y la contracción muscular, marcan un incremento en la concentración de creatina (por encima de 10 mM) y de fosfato inorgánico (Pi) (7 mM en el EDL y 5.7 mM en el SOL) en el sarcoplasma (Carvalho, McKee & Green, 1996). Por otro lado, el aumento de la concentración de piruvato y la hipoxia determinan un incremento importante en la concentración de lactato (5 veces mayor en el ERLC y 7 veces mayor en SOL) (Carvalho, McKee & Green, 1996) y una disminución del pH intracelular (pH_i), la cual es más marcada en el SOL que en el EDL durante esta primera hora de isquemia (-0,26 en el EDL y -0,34 en el SOL) (Carvalho, McKee & Green, 1996). En este contexto, algunos de los efectos inducidos por 1 hora de isquemia en la función muscular observados en estudios previos y en nuestro estudio, podrían ser explicados por el incremento en la concentración de Pi y la caída del pH intracelular. Se ha propuesto que el Pi puede afectar la liberación de Ca^{2+} desde el RS de varias maneras: (1) activación de la salida de Ca^{2+} desde el RS a través de las bombas tipo SERCA actuado en forma reversa (Duke & Steele, 2000), (2) la precipitación de fosfato de Ca^{2+} dentro del RS (Fryer *et al.*, 1995) y (3) la modulación de la activación del RyR1 (Fruen *et al.*, 1994). Se conoce que la activación reversa las bombas tipo SERCA requiere niveles citoplasmáticos de ADP cercanos a los 100 a 200 μM y la concentración de PCr debe estar por debajo de los 10 mM (Duke & Steele, 2001). En nuestro caso es posible que durante la isquemia, la concentración de la PCr esté por debajo de los 10 mM, pero la concentración de ADP nunca superará los 20 μM , lo cual permite descartar el efecto de la actividad reversa de las bombas tipo SERCA durante las dos primeras horas de isquemia.

En cuanto a la precipitación del fosfato de Ca^{2+} , si bien su producto de solubilidad in-vitro es de 6 mM^2 (Allen, Lamb & Westerblad, 2008), se ha medido que en fibras aisladas del músculo EDL, manteniendo el Ca^{2+} libre en 100 nM, 5 mM de Pi externo constituyen un umbral a partir del cual se observa que el Ca^{2+} libre en el RS comienza a disminuir, indicando que esta concentración de Pi en este músculo es suficiente para inducir la precipitación del fosfato de Ca^{2+} en las cisternas del RS (Duke & Steele, 2001). Anticipar estos efectos en nuestro sistema experimental no es posible. No se conoce el curso temporal de la liberación de Pi en la primera hora de isquemia y carecemos de datos directos del músculo SOL y del ERLC. Sin embargo, se podría inferir que los cambios reportados por Carvalho y otros en 1996, serían menos drásticos en la primera media hora de isquemia, cuando observamos los cambios más significativos en nuestro modelo. Según esto y considerando que las concentraciones de Pi alcanzaron los 7 mM en el EDL y los 5.7 mM en

el SOL (Carvalho, McKee & Green, 1996), luego de la primera hora de isquemia, es improbable que los efectos observados en la primera media hora de isquemia se deban a una precipitación de fosfato de Ca^{2+} en la luz del RS. A partir de la segunda hora de isquemia y considerando los niveles alcanzados por el Pi en ambos grupos musculares, es posible que si haya precipitación del fosfato de Ca^{2+} . Esta precipitación produciría una disminución del Ca^{2+} libre intrareticular, la cual provocaría una disminución del Ca^{2+} liberado desde el RS y la activación de la entrada de Ca^{2+} mediante el mecanismo del SOCE. Dependerá de la actividad de las bombas tipo SERCA recuperar el Ca^{2+} entrante. En nuestro modelo y debido a una caída en el pH_i es posible pensar que las bombas tipo SERCA estarán recapturando el Ca^{2+} más lentamente (Wolosker *et al.*, 1997), sin embargo, es posible pensar que aun a las bajas tasas de recuperación que habría en las condiciones de acidosis que se instalan durante la isquemia, dado el tiempo de 10 minutos entre cada estímulo, las bombas tendrían tiempo suficiente para que su actividad, lenta pero constante, resulte en una acumulación neta de Ca^{2+} en el retículo.

Uno de los efectos del Pi que podría ocurrir en nuestro modelo experimental durante la primera hora de isquemia es la modulación de la activación del RyR1 (Fruen *et al.*, 1994). En 2001, Duke y Steele demostraron que en presencia de concentraciones normales de Mg^{2+} (0,5 a 1 mM), el Pi en una concentración de 5 mM produce una disminución del 30% en la cantidad de Ca^{2+} que es liberado desde el RS mediante el mecanismo de DICR. Si las concentraciones de Mg^{2+} aumentan a 1,5 mM, la liberación de Ca^{2+} disminuye en un 60%. Para los aumentos de Pi observados previamente para las 2 primeras horas de isquemia (6 a 7 mM) (Carvalho, McKee & Green, 1996), en nuestro modelo, en presencia de 1 mM Mg^{2+} la caída en la liberación de Ca^{2+} sería de un 30% mediante el mecanismo de CICR inducido por cafeína, y caería a un 70-80% en presencia de 1,5 mM Mg^{2+} (Duke & Steele, 2001). Durante isquemia por 3 horas se ha observado que el Pi puede aumentar hasta 8 a 10 mM (Carvalho, McKee & Green, 1996). En esas condiciones la caída en la liberación de Ca^{2+} sería de un 40% en 1 mM Mg^{2+} y hasta de un 80% en presencia de 1,5 mM Mg^{2+} . Considerando que en nuestro modelo es bastante posible que la concentración de ATP se mantenga normal durante la primera hora de isquemia, es poco probable que la concentración de Mg^{2+} aumente desde sus valores normales en este rango de tiempo. Sin embargo, a partir de la segunda hora de isquemia, cuando la concentración de ATP comienza a disminuir, es posible un incremento en la concentración de Mg^{2+} que amplifique el efecto inhibitorio del Pi sobre la liberación de Ca^{2+} .

Se ha descrito que la acidosis del sarcoplasma induce un aumento en la actividad de la bomba de Na^+/K^+ (Clausen, 2009). La disminución del pH intracelular parece ser responsable de los cambios observados en el potencial eléctrico de reposo del sarcolema que pasa desde -90 mV a -60 mV (Jennische, Hagberg & Haljamäe, 1982). Igualmente, se ha reportado que las bombas tipo SERCA ensayadas en homogenados, incrementan su actividad durante isquemia (Green *et al.*, 1996). El EDL lo hace en un 40% durante la primera hora de isquemia, mientras que el SOL no aumenta durante esta hora

(Green *et al.*, 1996). En la segunda hora la actividad de la bomba en ambos músculos aumenta entre un 40 y un 80% (Green *et al.*, 1996). Se desconoce el mecanismo que da origen de este aumento en la actividad de las SERCA, sin embargo, el mismo grupo ha reportado posteriormente que las SERCA podrían sufrir un cambio conformacional que explicaría una disminución en la actividad de las SERCA durante la isquemia muscular, cuando estas bombas son ensayadas en vesículas (Tupling *et al.*, 2001). Igualmente, se ha reportado que el pH ácido induce una disminución de la afinidad de las SERCA por el Ca^{2+} (Wolosker *et al.*, 1997) lo cual enlentecería la tasa de recaptura de Ca^{2+} . Aunque en principio los resultados lucen contradictorios, nuestros resultados con el tiempo medio de relajación y tasa máxima de relajación soportan el hecho de que la actividad de las bombas tipo SERCA estaría disminuida durante la isquemia, posiblemente por efecto de la acidez intracelular.

6.3. Efectos metabólicos durante isquemia sobre la contracción muscular:

En los modelos actuales del mecanismo contráctil la cabeza de miosina se uniría en dos tiempos al filamento de actina, primero habría una unión débil y luego una unión fuerte (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). En este modelo la liberación del Pi por parte de la miosina promovería un incremento en la fuerza de unión entre las dos proteínas (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Esto implica que la transición a un estado de elevada tensión entre la miosina y la actina podría ser inhibida si el Pi sarcoplasmático se incrementa. Este mecanismo sería responsable de una caída del 10% de la fuerza máxima a temperaturas fisiológicas (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Un segundo mecanismo inducido por el aumento de la concentración de Pi en el sarcoplasma, que también podría afectar la producción de fuerza, es la disminución de la sensibilidad de las miofibrillas por el Ca^{2+} inducida por el Pi (Millar & Homsher, 1990). Se ha observado que este efecto es más marcado cuando disminuye la concentración de Ca^{2+} intracelular y es más acentuado a 30 que a 15 °C (Debold, Romatowski & Fitts, 2006). El elevado Pi en el sarcoplasma podría igualmente tamponar el Ca^{2+} intracelular y disminuir la cantidad del mismo que se podría unir a la troponina C (Millar & Homsher, 1990).

Previamente se ha reportado que la fuerza tetánica disminuye en un 60% en el músculo gastrocnemio de ratas cuando el pH intracelular disminuye a 6,9 (Baker *et al.*, 1994). Se ha observado sin embargo que este efecto se minimiza cuando el músculo opera a temperaturas por encima de 30 °C, situación en la cual la disminución de la fuerza sería apenas de un 10% (Adams, Fisher & Meyer, 1991). Se ha propuesto igualmente que las disminuciones del pH_i pueden disminuir la sensibilidad de la maquinaria contráctil por el Ca^{2+} . Específicamente se ha propuesto que los H^+ pueden competir con el Ca^{2+} por el sitio de unión a la troponina C (Donaldson, Hermansen & Bolles, 1978). Sin embargo, este efecto estaría compensado por el hecho de que la disminución del pH intracelular a 6,3, disminuye unas 5 veces (0,14 a 0,72 microM) la afinidad de las bombas tipo SERCA por el Ca^{2+} (Wolosker *et al.*, 1997). En este

contexto, la cantidad de Ca^{2+} libre para unirse a la troponina C sería mayor en condiciones de acidosis que en condiciones normales, por lo cual este efecto del bajo pH sería mínimo. De hecho, se ha propuesto que en condiciones ácidas la fuerza muscular podría aumentar debido a la menor afinidad de las SERCA por el Ca^{2+} (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). De esta forma, la evidencia sugiere que los efectos del bajo pH intracelular sobre la maquinaria contráctil serían mínimos para explicar la caída observada en la fuerza máxima en nuestro modelo de isquemia.

Se ha determinado que es necesario que el ATP intracelular disminuya por debajo de 20 μM para que se observe una caída en la fuerza máxima y la afinidad de las bombas SERCA por el Ca^{2+} (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Igualmente la elevación de los niveles de IMP por encima de 3 mM también afectarían la recaptura de Ca^{2+} por parte de las bombas (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). La disminución del ATP a niveles por debajo de 0,5 mM también producirán una disminución de la liberación de Ca^{2+} desde el RS (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). En condiciones de bajo ATP es muy probable un incremento en la concentración de Mg^{2+} libre, lo cual exacerbará los efectos de las caídas del ATP. Así mismo se ha reportado que la disminución del glucógeno intramuscular, afecta la maquinaria de liberación de Ca^{2+} , pero se desconocen los mecanismos que estarían involucrados en esta interacción (Allen, Lamb & Westerblad, 2008).

6.4. 1 hora de isquemia:

En nuestro modelo, durante la primera hora de isquemia, ambos músculos presentan los mayores cambios observados durante toda la etapa de isquemia. Uno de los parámetros que más se ve afectado es el tiempo de latencia, el cual aumenta en ambos músculos, solo que el cambio se da 20 minutos más rápidamente en el músculo SOL que en el músculo ERLC. El tiempo de latencia se puede dividir en 5 fases; (1) iniciación y propagación de los potenciales de acción a través del sarcolema y los túbulos T (mediado principalmente por los Na_v), (2) transmisión de la señal desde los túbulos T hasta el retículo sarcoplasmático (acoplamiento entre los DHPR y los RyR1), (3) liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (mecanismo de DICR), (4) aumento de las concentraciones de Ca^{2+} en el sarcoplasma, (5) Unión del Ca^{2+} a la troponina C y exposición de los sitios de alta afinidad de la actina por la miosina (frecuencia de unión del Ca^{2+} a la troponina C) (Stephenson, Lamb & Stephenson, 1998). Una característica del aumento en el tiempo de latencia, es que una vez se inicia, el aumento se da linealmente hasta más o menos 1 hora y 30 minutos en condiciones de isquemia. En este momento hay otro(s) cambio(s) que marcan un comportamiento diferente del parámetro. Este aumento lineal contrasta con los cambios en la fuerza máxima, la integral fuerza-tiempo, la tasa máxima de contracción y la tasa de relajación, cuyos cambios tienen todos, una tendencia a ser bifásicos, más rápidos en los primeros 30 minutos y más lentos en los segundos 30 minutos. De otro lado, el tiempo de contracción y el tiempo medio de relajación cambian linealmente en

los primeros 20 minutos, para estabilizarse en nuevo estado estacionario, hasta más o menos 1 hora y 30 minutos en condiciones de isquemia.

En este contexto, el tiempo de latencia dependerá de un mecanismo que pueda ser resistente al cambio en el ERLC en los primeros 20 minutos de isquemia y que cambie linealmente una vez se establece el cambio. Considerando que el agotamiento de la reserva de PCr es primero que la de glucógeno, es posible pensar que los efectos del Pi antecederían a los del cambio en el pH_i . Así mismo, el músculo ERLC tiene mayor capacidad que el músculo SOL para reponer sus reservas de ATP en condiciones anaeróbicas, debido a su mayor concentración de PCr (Carvalho, McKee & Green, 1996; Karatzaferi, Haan & Ferguson 2001), mayor concentración de glucógeno y de enzimas glucolíticas (Carvalho, McKee & Green, 1996; Berney & Levy, 2004; Leiber, 2004), lo cual permite pensar que el aumento en la concentración de Pi empezaría primero y sería más rápida en el SOL que en el ERLC. Esto es evidenciado en que mientras en el SOL la caída en el ATP durante la primera hora es de un 31%, el ERLC es de 22%, y por otro lado el aumento del Pi en la primera hora es de un 89% en el SOL, mientras que en el ERLC lo hizo en un 75%. Según esto el incremento inicial del Pi tamponaría el Ca^{2+} y disminuiría la velocidad con que el mismo se uniría a la troponina C (Millar & Homsher, 1990). Este efecto sería más marcado y más rápido en el SOL considerando que cuenta con una maquinaria contráctil más lenta que la del ERLC, en el cual se requerirían niveles más altos de Pi para observar el mismo efecto de enlentecimiento en el inicio de la contracción. El aumento gradual en el Pi en ambos músculos haría que la competencia entre el Pi y la troponina C por el Ca^{2+} sea cada vez mayor, prolongando linealmente el tiempo de latencia (ver figura 51).

Este mismo incremento en los niveles de Pi sería el principal responsable de la disminución en producción de fuerza debido a la disminución de la sensibilidad de las miofibrillas por el Ca^{2+} inducida por el Pi (Millar & Homsher, 1990; Stephenson, Lamb & Stephenson, 1998; Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Este efecto no retrasaría la contracción, pero si induciría que se desarrollara menor tensión y el efecto estaría presente a los 10 minutos en ambos músculos, evidenciado en la caída de la tasa máxima de contracción y como consecuencia de ello en la fuerza máxima de la sacudida y en la integral fuerza-tiempo de la sacudida. Como se mencionó este efecto es más marcado a los 32 °C que mantuvimos en nuestro sistema experimental y cuando disminuye la concentración de Ca^{2+} intracelular (Debold, Romatowski & Fitts, 2006). Un último efecto del aumento en la concentración de Pi sería disminución de la cantidad de Ca^{2+} que es liberado desde el RS mediante el mecanismo de DICR. Este efecto se evidenciaría en ambos músculos en la caída gradual que se observa en el tiempo de contracción durante los primeros 10 a 20 minutos en isquemia. Atendiendo lo que ocurre en esas curvas, la disminución de la liberación de Ca^{2+} se estabilizaría durante 1 hora y media, tiempo después del cual volvería caer esta vez posiblemente por efecto del fosfato de Ca^{2+} que se empieza a precipitar en el RS (ver figura 51).

Finalmente, aunque el Pi en ausencia de altas concentraciones de ADP, no haría funcionar la bomba tipo SERCA en sentido reverso, si puede disminuir su actividad (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). Este efecto sería exacerbado por la caída en los niveles de PCr (Allen, Lamb & Westerblad, 2008), la cual ocurrirá mas rápidamente en el SOL que en ERLC. Si el transitorio de Ca^{2+} disminuye en ambos músculos, la fuerza máxima y el tiempo de contracción disminuirán tal como ocurre en ambos músculos. Si la relajación depende exclusivamente de una bomba tipo SERCA trabajando a menor velocidad por efecto del Pi, el tiempo medio de relajación aumentará y la tasa máxima de relajación disminuirá tal como ocurre en el músculo SOL durante los primeros 20 minutos. Cuando en la relajación se involucra un buffer de Ca^{2+} como la parvalbumina, para un transitorio de Ca^{2+} de menor tamaño, se espera que la relajación sea más rápida, es decir que el tiempo medio de relajación disminuya, mientras que la tasa máxima de relajación se podría mantener estable, tal como ocurre en el músculo ERLC durante los primeros 20 minutos. Esto considerando que el efecto del Pi para enlentecer las bombas de Ca^{2+} no disminuya grandemente su tasa de bombeo, lo cual se podría esperar para unas bombas tipo SERCA que trabajan tres veces más rápido que las del músculo SOL. Consideramos que a los 20 minutos en isquemia se empezaría a adicionar el efecto inhibitorio del pH sobre la actividad de las bombas tipo SERCA y que por su mayor velocidad este efecto sería más pronunciado sobre las bombas del ERLC. En este caso, el tiempo medio de relajación tendería a aumentar y la tasa máxima de relajación tendería a caer, tal como se observa en el ERLC a partir de los 20 minutos en isquemia. Esto debido a que la mayor lentitud de las bombas generaría una recirculación del Ca^{2+} entre la bomba, la parvalbumina y la troponina C (ver figura 51).

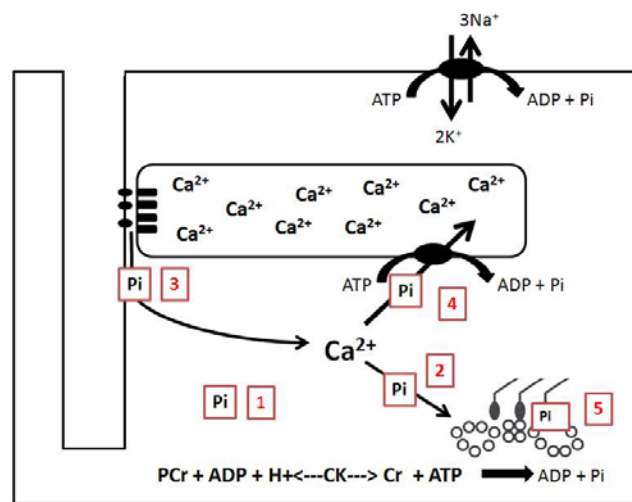


Figura 51. Resumen del efecto del Pi en los parámetros funcionales durante la primera hora de isquemia muscular. Se muestran los puntos donde el Pi podría alterar la función muscular. (1) Efecto tampón del Ca^{2+} intracelular que podría aumentar el tiempo de latencia al disminuir la velocidad con que el Ca^{2+} se une a la troponina. (2) Disminución de la afinidad de la maquinaria contráctil por el Ca^{2+} , lo cual también contribuiría a aumentar el tiempo de latencia, a disminuir la tasa de desarrollo de fuerza y por lo mismo la fuerza máxima y la integral fuerza-tiempo. (3) Disminución de la liberación de Ca^{2+} por efecto del Pi sobre el RyR1, lo cual contribuiría a disminuir el tiempo de contracción durante los primeros 20 minutos de isquemia en ambos grupos musculares. (4) Disminución de la tasa de recaptura de Ca^{2+} por inhibición de las

bombas tipo SERCA. Este efecto sería aumentado por la caída en los niveles de PCr. Este efecto aumentaría el tiempo medio de relajación y disminuiría la tasa máxima de relajación en el musculo SOL. Estos efectos serían compensados por la parvalbumina en el musculo ERLC. (5) Al aumentar su concentración P_i se liberaría más lento del complejo actina-miosina, impidiendo que el mismo asuma una conformación de mayor tensión. Este efecto contribuiría a disminuir la fuerza máxima y la integral fuerza-tiempo.

Los efectos del pH sobre la maquinaria contráctil y la afinidad de la troponina C por el Ca^{2+} serían más tardíos y contribuirían menos, pero agravarían toda la serie de cambios iniciados por el P_i . El efecto más importante del pH sería sin duda el enlentecimiento de la recaptura de Ca^{2+} hacia el RS por parte de las bombas tipo SERCA en ambos músculos. Consideramos que este efecto se evidenciaría primero en el SOL y luego en el ERLC, debido a que en este segundo músculo, el pH intracelular caería más lentamente, lo cual se muestra en sus mayores niveles de PCr y ATP, menores niveles de lactato y menor caída del pH_i , luego de 1 hora de isquemia. Se conoce además, que las fibras glicolíticas presentan una mayor capacidad tampón de H^+ que aquella de las fibras oxidativas. Esta mayor capacidad está representada por mayores niveles de fosfatos, de residuos de histamina, de carnosina, de anserina y de balenina (Abe 2000) (ver figura 52). Otro factor que pudiera ser importante es que a partir de los 20 minutos la caída en el pH intracelular disminuirá aun más la afinidad de la troponina C por el Ca^{2+} . Si bien el efecto esperado sobre la fuerza máxima no es tan importante, este nuevo efecto puede contribuir a enlentecer aun más el tiempo de latencia en el musculo ERLC (ver figura 52).

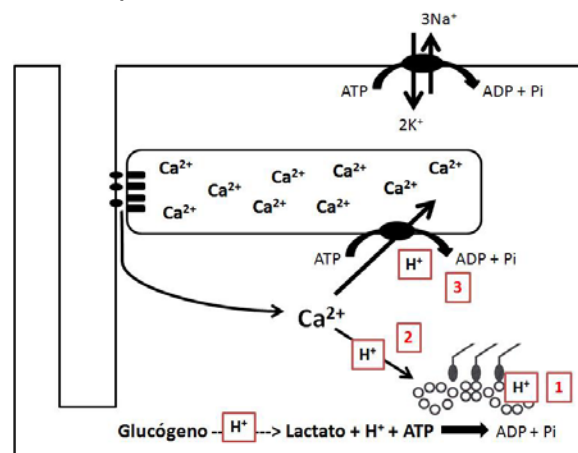


Figura 52. Resumen del efecto de la disminución del pH en los parámetros funcionales durante la primera hora de isquemia muscular. Se muestran los puntos donde el pH podría alterar la función muscular. (1) Efecto directo de los H^+ sobre la maquinaria contráctil, lo cual a la temperatura experimental de este modelo puede contribuir a disminuir la fuerza máxima y la integral fuerza-tiempo en un 10%. (2) Disminución de la afinidad de la maquinaria contráctil por el Ca^{2+} , lo cual también contribuiría a aumentar el tiempo de latencia, a disminuir la tasa de desarrollo de fuerza y por lo mismo la fuerza máxima y la integral fuerza-tiempo. (3) Disminución de la tasa de recaptura de Ca^{2+} por inhibición de las bombas tipo SERCA. Este efecto tendería a aumentar el tiempo medio de relajación y disminuiría la tasa máxima de relajación en el musculo ERLC. Estos efectos no serían por la parvalbumina.

6.5. 2 horas de isquemia:

Durante la segunda hora de isquemia el ATP intracelular aumenta su tasa de decrecimiento, llegando a concentraciones de 2,3 mM y 1,2 mM al final de las 2 horas de isquemia en el ERLC y el SOL, respectivamente (Carvalho, McKee & Green, 1996). Si bien estos niveles comienzan a ser bajos y pueden contribuir a disminuir la liberación de Ca^{2+} desde los RyR1 (Allen, Lamb & Westerblad, 2008) y a disminuir la tasa máxima de bombeo de las bombas iónicas, son niveles aun suficientes para sostener los gradientes iónicos y la actividad contráctil del musculo (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). También se esperaría un incremento en los niveles de Mg^{2+} , suficientes para disminuir la liberación de Ca^{2+} desde el RS. En ausencia de una gran actividad eléctrica, la bomba de Na^+/K^+ mantendría una actividad basal, estimulada por la acidez del medio intracelular, suficiente para evitar una disipación de los gradientes de estos dos iones. La bomba de Ca^{2+} seguramente seguirá trabajando aunque con menor velocidad en ambos grupos musculares.

En estas condiciones otros factores de alerta comienzan a emerger en el músculo. Los nucleótidos totales ahora caen por debajo de un 50% y los niveles de IMP, inosina e hipoxantina continúan aumentando de forma considerable en esta segunda hora de isquemia, indicando que las fibras comienzan a perder de forma irreversible sus fuentes de energía (Carvalho, McKee & Green, 1996). La PCr, la creatina y el Pi se mantienen en los niveles alcanzados al final de la primera hora (Carvalho, McKee & Green, 1996). El glucógeno cambia levemente, pero el lactato aun muestra incrementos aunque no tan importantes como en la primera hora (Carvalho, McKee & Green, 1996). Esto sugiere que la glicolisis es la que trata de mantener normales los niveles de ATP en ambos grupos musculares. El cambio en el pH es menor que en la primera hora, pero ahora igual en ambos grupos musculares (-0,22) (Carvalho, McKee & Green, 1996).

En este contexto durante la segunda hora se esperaría una exacerbación de todos los eventos que se presentaron durante la primera hora. Disminución de la fuerza máxima, disminución de la integral fuerza-tiempo, disminución de la tasa máxima de contracción, disminución de la tasa máxima de relajación, aumento del tiempo de latencia, aumento del tiempo medio de relajación y disminución del tiempo de contracción. Efectos todos mediados por el Pi y la disminución del pH_i tal como se explica en las figuras 51 y 52. Es posible que los incrementos en el IMP y la inosina contribuyan a enlentecer aun más la actividad de la bomba. Mas allá de la profundización de estos efectos negativos sobre la función muscular, un aspecto que llama la atención es que durante la segunda hora de isquemia muscular se observa un mayor deterioro funcional en el músculo ERLC que en músculo SOL. Así, hay mayor disminución de la fuerza máxima de sacudida simple, de la integral fuerza- tiempo, de la tasa máxima de contracción y de la tasa máxima de relajación.

Consideramos que este efecto se debe a la precipitación de fosfato de Ca^{2+} en el interior del RS. Se ha descrito que este fenómeno, una vez ocurre va a

afectar en mayor medida a los músculos glicolíticos que a los oxidativos, debido a la mayor capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} que poseen en el RS (Posterino & Dunn, 2008). La disminución de la concentración de ATP favorece que el Pi entre al RS a través de canales de Cl^- . En esta segunda hora el ATP se está degradando a mayor velocidad, aumentando los niveles de Pi libre, sin embargo, los niveles de Pi cambian poco (Carvalho, McKee & Green, 1996), indicando que su destino sería entrar al RS donde empezará a precipitarse con el Ca^{2+} en ambos grupos musculares, considerando que al final de la primera hora ya se ha superado el umbral para su precipitación (5 mM) que ha sido descrito previamente (Duke & Steele, 2001).

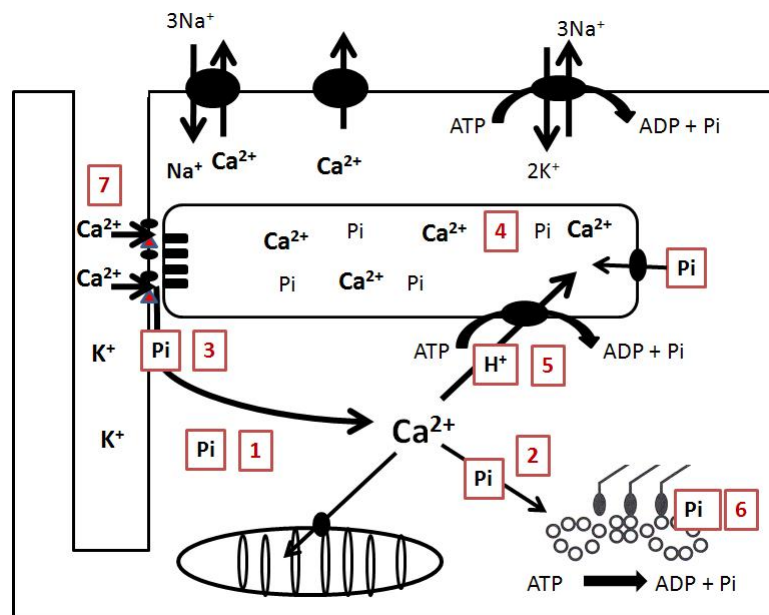


Figura 53. Resumen de los efectos acumulados de Pi y pH en los parámetros funcionales durante la segunda hora de isquemia muscular. Se muestran los puntos donde el Pi y el pH podría alterar la función muscular. (1) Efecto tampón del Ca^{2+} intracelular. (2) Disminución de la afinidad de la maquinaria contráctil por el Ca^{2+} . (3) Disminución de la liberación de Ca^{2+} por efecto del Pi sobre el RyR1 . (4) Precipitación del fosfato de Ca^{2+} en el interior del RS. Esta precipitación disminuye la liberación de Ca^{2+} y disminuye el Ca^{2+} libre dentro del retículo, activando el mecanismo del SOCE. (5) Disminución de la tasa de recaptura de Ca^{2+} por inhibición de las bombas tipo SERCA. (6) Efecto del Pi sobre la fuerza producida por el complejo actina-miosina. (7) Activación de la entrada de Ca^{2+} a la fibra a través del mecanismo del SOCE. Las bombas tipo SERCA lo transportan al retículo, contribuyendo a saturar el retículo de fosfato de Ca^{2+} precipitado.

La precipitación del fosfato de Ca^{2+} , disminuye el Ca^{2+} libre dentro del retículo, activando la entrada de Ca^{2+} al saroplasma a través del mecanismo de “store-operated Ca^{2+} entry” (SOCE) (Cheng & Lederer, 2008). A pesar de su mayor capacidad, el fosfato de Ca^{2+} se acumularía más rápidamente en el RS del ERLC debido a que se libraría menos Ca^{2+} en cada sacudida, por efecto del bloqueo del menor Ca^{2+} libre dentro del RS, el Mg^{2+} aumentado, el bajo ATP, el Pi aumentado y el Ca^{2+} entrando por el mecanismo del SOCE. Por otro lado, estos músculos inicialmente mantienen mayor recaptura de Ca^{2+} . Como resultado de estos cambios la fuerza cae más rápidamente hacia cero en el ERLC que en el SOL. Así mismo, al saturarse de Ca^{2+} el retículo las bombas

tipo SERCA empezarán a actuar en forma reversa, liberando al citoplasma todo el Ca^{2+} acumulado durante la fase de precipitación del fosfato de Ca^{2+} . Consideramos que a partir de aquí comienza un punto de no retorno para ambos músculos, en el cual el Ca^{2+} libre aumentado en el citoplasma, activará una serie de procesos que llevarán finalmente a la muerte de la fibra muscular (ver figura 53).

6.6. 3 horas de isquemia:

Durante la tercera hora de isquemia el ATP disminuye hasta llegar a valores de 300 μM en ambos grupos musculares (Carvalho, McKee & Green, 1996). Estos niveles de ATP son críticos y seguramente significaran la detención de la actividad de las bombas iónicas y de la maquinaria contráctil (Allen, Lamb & Westerblad, 2008). En este contexto se esperaría un incremento mayor en los niveles de Mg^{2+} , suficiente para bloquear completamente la liberación de Ca^{2+} desde el RS de ambos grupos musculares. Se espera igualmente la disipación de los gradientes iónicos y una gran acumulación de Ca^{2+} en el sarcoplasma. La principal fuente de Ca^{2+} sería la bomba tipo SERCA transportando el Ca^{2+} en forma reversa debido a la saturación de los depósitos intracelulares. La mayor parte de los efectos en esta tercera hora de isquemia, cuando se observa un deterioro en todos los parámetros de la sacudida simple con muy poca recuperación en los dos grupos musculares durante la reperfusión, se deben fundamentalmente a un aumento sostenido de la concentración de Ca^{2+} intracelular. (Fredsted *et al.*, 2005).

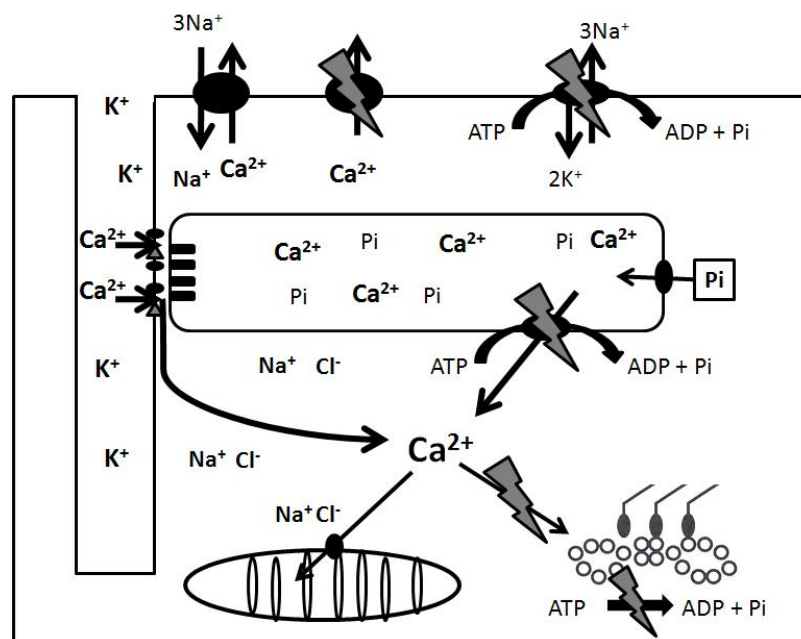


Figura 54. Resumen de los efectos metabólicos acumulados en la concentración de Ca^{2+} intracelular durante la tercera hora de isquemia muscular. La disminución de ATP y el llenado total del RS con Ca^{2+} y fosfato de Ca^{2+} , producen el funcionamiento reverso de la bomba de

Ca^{2+} tipo SERCA. La caída en el ATP produce la disfunción de las bombas iónicas generando una acumulación de Ca^{2+} , Na^+ y Cl^- intracelular, generando edema y activando mecanismos de muerte celular dependientes de Ca^{2+} . Pese a la elevación de la concentración de Ca^{2+} la maquinaria contráctil está disfuncional por los efectos del bajo pH y el Pi aumentado.

El aumento sostenido de la concentración de Ca^{2+} intracelular provoca inicialmente un aumento en la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial (Gissel 2005), lo que conlleva a un aumento de la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS), las cuales producen peroxidación de los lípidos de la membrana celular, lo cual aumentaría la permeabilidad de la misma a los iones Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- y K^+ , contribuyendo a disipar los gradientes de estos iones (Gissel 2005). Se incrementará igualmente la actividad de la fosfolipasa A_2 (Gissel 2005), la cual puede incrementar aún más la permeabilidad del sarcolema. La acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial en presencia de altas concentraciones de Pi , pueden producir la precipitación de fosfato de Ca^{2+} en esta matriz, lo cual puede llevar a la muerte de las mitocondrias. Este evento marca un punto de no retorno, ya que las fibras tendrán imposibilidad total de reponer sus reservas de ATP (Gissel 2005). El incremento de la concentración de Ca^{2+} provoca igualmente la activación de las calpainas (Gissel 2005), las cuales inducen la proteólisis de las proteínas del sarcolema incluyendo las proteínas contráctiles (Gissel 2005). Todos estos acontecimientos en última instancia producen lesiones celulares las cuales se van a acrecentar si el proceso de isquemia perdura en el tiempo.

6.7. Reperusión:

El proceso de reperusión se ha investigado previamente (Rácz, Sarkadi & Hamar, 1996; Carvalho, McKee & Green, 1997; Woitaske & McCarter, 1998; Walters, Kragh & Baer, 2008). Estas investigaciones se centran en el estudio de la fuerza máxima en sacudida simple y de la tensión tetánica de los músculos. Nuestro estudio, en similitud a estos estudios previos, indica que los músculos SOL (oxidativo) y ERLC (glicolítico) durante una hora de isquemia seguida de una hora de reperusión no presentan diferencias significativas en los 7 parámetros funcionales evaluados. En estas condiciones la mayoría de los parámetros estudiados se recuperan en un elevado porcentaje indicando que los efectos mediados por el Pi y el bajo pH intracelular son altamente reversibles en este punto. El pH recuperaría sus valores normales una vez se restituya el flujo sanguíneo y el Pi disminuirá en la medida en que las fibras restituyen sus reserva de energía en forma de ATP y PCr. Se observa que la recuperación es más rápida en el músculo SOL, evidenciado el papel del oxígeno y la mitocondria en la recuperación de este grupo muscular. Se ha demostrado que los músculos oxidativos recuperan un 100% los niveles de ATP, ADP, AMP, IMP durante la fase reperusión, mientras que los músculos glicolíticos solo se recuperan en un 50% (Idström *et al.*, 1990).

La reperusión luego de dos y tres horas de isquemia promueve una recuperación muy pobre en ambos grupos musculares, siendo ligeramente mayor la recuperación del músculo SOL. Esto podría reflejar nuevamente su capacidad para utilizar el oxígeno y su mayor número de mitocondrias. Igualmente podría reflejar la menor acumulación de Ca^{2+} intracelular durante el

proceso de isquemia a 2 horas. Ciertamente los mayores niveles de Ca^{2+} que aparentemente se acumularían en el musculo ERLC, provocarían mayores niveles de lesión tal como se describió arriba. Finalmente, cabe resaltar el aumento que se observa en el tiempo medio de relajación durante la primera hora de reperfusión en ambos grupos musculares luego de 1 hora de isquemia. Este efecto no se observa luego de 2 y 3 horas de isquemia. Este fenómeno, aunque no resultó ser significativamente diferente con los controles, podría reflejar una disminución de la actividad de las bombas de Ca^{2+} tipo SERCA durante la etapa de reperfusión. Reportes previos en homogenizados indican que durante la reperfusión, la actividad de estas bombas presentan una disminución de alrededor del 12% en los músculos glicolíticos y del 24% en el músculo oxidativo (Green *et al.*, 1997). Este fenómeno podría ser similar al fenómeno de hipercontractura observado en el musculo cardiaco durante la reperfusión sanguínea (Ma, Qui & Chen, 2008).

7. BIBLIOGRAFIA.

- Abe, H. (2000). Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituent in vertebrate muscle. *Biochemistry* 65: 757-765.
- Adams, G.R., Fisher, M.J., Meyer, R.A. (1991) Hypercapnic acidosis and increased H_2PO_4^- concentrations do not decrease force in cat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 260: C805–C812.
- Allen, D.G. (2004). Skeletal muscle function: role of ionic changes in fatigue, damage and disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31(8): 485-93.
- Allen, D.G., Lamb, G.D., Westerblad, H. (2008). Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. *Physiol. Rev.* 88: 287–332.
- Arieli, D., Nahmany, G., Casap, N., Ad-El, D., Samuni, Y. (2008). The effect of a nitroxide antioxidant on ischemia-reperfusion injury in the rat in vivo hind limb model. *Free Rad. Res.* 42(2): 114-123.
- Babsky, A.M., Topper, S. (2008). Evaluation of Extra- and Intracellular Apparent Diffusion Coefficient of Sodium in Rat Skeletal Muscle: Effects of Prolonged Ischemia. *Magnetic Resonance in Medicine* 59: 485–491.
- Baker, A.J., Carson, P.J., Miller, R.G., Weiner, M.W. (1994). Metabolic and nonmetabolic components of fatigue monitored with ^{31}P -NMR. *Muscle Nerve* 17: 1002–1009.
- Bennetts, B. Parker, M.W., Cromer, B.A. (2007). Inhibition of Skeletal Muscle ClC-1 Chloride Channels by Low Intracellular pH and ATP. *J. Biol. Chem.* 282 (45): 32780–32791.
- Berne R. and Levy M. Physiology. 5th edition. Mosby (2004).
- Blaisdell, F.W. (2002). The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc. Surg.* 10(6): 620-630.
- Bøggild, H. (2006). Ischemia and low-back pain--is it time to include lumbar angina as a cardiovascular disease? *Scand. J. Work. Environ. Health.* 32(1): 20-21.
- Bonde-Petersen, F., Schultz-Pedersen, L., Dragsted, N. (1992). Peripheral and central blood flow in man during cold, thermoneutral, and hot water immersion. *Aviat. Space. Environ. Med.* 63(5): 346-350.
- Cairns, S.P. (2006). Lactic Acid and Exercise Performance Culprit or Friend? *Sports Med.* 36: 279-291.

Carmo-Araújo, E.M., Dal-Pai-Silva, M., Dal-Pai, V., Cecchini, R. & Anjos-Ferreira A.L. (2007). Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies. *Int. J. Exp. Pathol.* 88(3): 147-154.

Carvalho, A.J. & McKee, N.H. (1992). Active and passive forces during ischemia and reperfusion of rat fast and slow twitch skeletal muscles. *Adv. Exp. Med. Biol.* 311: 365-8.

Carvalho, A.J. & McKee, N.H. (1996). Simultaneous assessment of isometric forces in fast- and slow-twitch muscles of single rat hindlimbs in situ. *Can. J. Appl. Physiol.* 21(1): 23-34.

Carvalho, A.J., McKee, N.H. & Green, H.J. (1996). Metabolic and contractile responses of fast- and slow-twitch rat skeletal muscles to ischemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74(12): 1333-1341.

Carvalho, A.J., McKee, N.H. & Green H.J. (1997). Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. *Plast. Reconstr. Surg.* 99(1): 163-171.

Cheng, H., Lederer, W.J. (2008) Calcium Sparks. *Physiol. Rev.* 88: 1491–1545.

Cherednichenko, G., Ward, C.W., Feng, W., Cabrales, E., Michaelson, L., Samso, M., Lopez, J.R., Allen, P.D., Pessah, I.N. (2008). Enhanced excitation-coupled calcium entry in myotubes expressing malignant hyperthermia mutation R163C is attenuated by dantrolene. *Mol. Pharmacol.* 73: 1203–1212.

Clarkson, P.M., Hubal, M.J. (2002). Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002 Nov;81(11 Suppl):S52-69.

Clausen, T. (2003) Na-K pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol. Rev.* 83: 1269-1324.

Cochrane, D.J. (2004). Alternating hot and cold water immersion for athlete recovery: a review. *Phys. Ther. Sport.* 5: 26-32.

Cohen, L., Ilan, N., Gur, M., Stühmer, W., Gordon, D., Gurevitz, M. (2007). Design of a specific activator for skeletal muscle sodium channels uncovers channel architecture. *J. Biol. Chem.* 282(40): 29424-29430.

Cifuentes, F., Vergara, J., Hidalgo, C. (2000). Sodium/calcium exchange in amphibian skeletal muscle fibers and isolated transverse tubules. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 279(1): C89-97.

Conrad, M.F., Albadawi, H., Stone, D.H., Crawford, R.S., Entabi, F., Watkins, M.T. (2006). Local administration of the Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP)

inhibitor, PJ34 during hindlimb ischemia modulates skeletal muscle reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 135(2): 233-237.

Coffey, V., Leveritt, M., Gill, N. (2004). Effect of recovery modality on 4-hour repeated treadmill running performance and changes in physiological variables. *J. Sci. Med. Sport.* 7(1): 1-10.

Debold, E.P., Romatowski, J., Fitts, R.H. (2006). The depressive effect of Pi on the force-pCa relationship in skinned single muscle fibers is temperature dependent. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 290: C1041–C1050.

Delbono, O., Meissner, G. (1996). Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Release in Rat Slow and Fast Twitch Muscles. *J. Membrane Biol.* 151: 123–130.

Donaldson, S.K., Hermansen, L., Bolles, L. (1978). Differential, direct effects of H^+ on Ca^{2+} -activated force of skinned fibers from the soleus, cardiac and adductor magnus muscles of rabbits. *Pflügers Arch.* 376: 55–65.

Duke, A.M., Steele, D.S. (2000). Characteristics of phosphate-induced Ca^{2+} efflux from the SR in mechanically skinned rat skeletal muscle fibres. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278: C126–C135.

Duke, A.M., Steele, D.S. (2001). Mechanisms of reduced SR Ca^{2+} release induced by inorganic phosphate in rat skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281: C418-C429.

Endo, M. (2009). Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev.* 89(4):1153-76.

Enwemeka, C.S., Allen, C., Avila, P., Bina, J., Konrade, J., Munns, S. (2002). Soft tissue thermodynamics before, during, and after cold pack therapy. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34(1): 45-50.

Favero, M., Jiang, D.J., Chiamulera, C., Cangiano, A., Fumagalli, G.F. (2008) Expression of small-conductance calcium-activated potassium channels (SK3) in skeletal muscle: regulation by muscle activity. *J. Physiol.* 586(Pt 19): 4763-74.

Fish, J.S., McKee, N.H., Pynn, B.R., Kuzon, W.M. Jr, Plyley, M.J. (1989). Isometric contractile function recovery following tourniquet ischemia. *J. Surg. Res.* 47(4): 365-70.

Forrester, T. (1972). An estimate of adenosine triphosphate release into the venous effluent from exercising human forearm muscle. *J. Physiol.* 224(3): 611-28.

Fredsted, A., Mikkelsen, U.R., Gissel, H., Clausen, T. (2005). Anoxia induces Ca^{2+} influx and loss of cell membrane integrity in rat extensor digitorum longus muscle. *Exp. Physiol.* 90(5): 703-714.

Fruen, B.R., Mickelson, J.R., Shomer, N.H., Roghar, T.J., Louis, C.F. (1994). Regulation of the sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor by inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.* 269: 192-198.

Fryer, M.W., Owen, V.J., Lamb, G.D., Stephenson, G.D. (1995). Effects of creatine phosphate and Pi on Ca^{2+} movements and tension development in rat skinned skeletal fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 482: 123-140.

Gardner, V.O., Caiozzo, V.J., Long, S.T., Stoffel, J., McMaster, W.C., Prietto, C.A. (1984). Contractile properties of slow and fast muscle following tourniquet ischemia. *Amer. J. Sports Med.* 12: 417-423.

Gastin, P.B. (2001). Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. *Sports Med.* 31: 725-741.

Gissel, H. (2005). The role of Ca^{2+} in muscle cell damage. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1066: 166-180.

Graven-Nielsen, T, Arendt-Nielsen, L. (2008). Impact of clinical and experimental pain on muscle strength and activity. *Curr. Rheumatol. Rep.* 10(6): 475-481.

Green, H.J., McKee, N.H., Carvalho, A.J., Dossett-Mercer, J.C. (1996). Ischemia-induced alterations in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity in rat soleus and EDL muscles. *Am. J. Physiol.* 271: 1942-1948.

Green, H.J., McKee, N.H., Carvalho, A.J., Phillips, S.M. (1997). Reductions in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase activity in rat skeletal muscles of different fibre composition with ischemia and reperfusion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75(1): 78-82.

Gürke, L., Marx, A., Sutter, P.M., Stierli, P., Harder, F., Heberer, M. (2000). Function of fast- and slow-twitch rat skeletal muscle following ischemia and reperfusion at different intramuscular temperatures. *Eur. Surg. Res.* 32(3): 135-141.

Hagberg, H. (1985). Intracellular pH during ischemia in skeletal muscle: relationship to membrane potential, extracellular pH, tissue lactic acid and ATP. *Pfluegers Arch.* 404: 342-347.

Hochachka, P.W. (1985). Fuels and pathways as designed systems for support of muscular work. *J. Exp. Biol.* 115: 191-200.

Howatson, G., van Someren, K.A. (2008). The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. *Sports Med.* 38(6):483-503.

Idström, J.P., Soussi, B., Elander, A., Bylund-Fellenius, A.C. (1990). Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 258: 1668-H1673.

Ivanics, T., Miklós, Z., Ruttner, Z., Bátkai, S., Slaaf, D.W., Reneman, R.S., Tóth, A., Ligeti, L. (2000). Ischemia/reperfusion-induced changes in intracellular free Ca^{2+} levels in rat skeletal muscle fibers - an in vivo study. *Pflugers Arch.* 440(2):302-308.

Jennische, E., Hagberg, H., Haljamie, H. (1982). Extracellular potassium concentration and membrane potential in rabbit gastrocnemius muscle during tourniquet ischemia. *Pfluegers Arch.* 392: 335-339.

Khanna, A., Cowled, P.A, Fitridge, R.A. (2005). Nitric oxide and skeletal muscle reperfusion injury: current controversies. *J. Surg. Res.* 128(1): 98-107.

Karatzaferi, C., Haan, A., Ferguson, R.A. (2001). Phosphocreatine and ATP content in human single muscle fibres before and after maximum dynamic exercise. *Eur. J. Physiol.* 442: 467-474.

Korth, U., Merkel, G., Fernandez, F.F., Jandewerth, O., Dogan, G., Koch, T., van Ackern, K., Weichel, O., Klein, J. (2000). Tourniquet-induced changes of energy metabolism in human skeletal muscle monitored by microdialysis. *Anesthesiology* 93(6): 1407-1412.

Lamb, D., Walsh, T. (1987). Calcium currents, charge movement and Dihydropyridine binding in fast and slow twitch muscles of rat and rabbit. *J. Physiol.* 393: 595-617.

Leiber L. Richard. Estructura Del Músculo Esquelético, Función y Plasticidad. Segunda Edición, Editorial Mc Graw Hill. 2004.

Ma, A., Qui, S., Chen, H. (2008). Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection. *Cardiovasc. Hematol. Agents. Med. Chem.* 6(1): 20-43.

Martínez-Morillo, M., Pastor-Vega, J.M. & Sendra-Portero, F. (1998). Manual de medicina física. Editorial Harcourt Brace.

Martínez, S.E. (2009). Incidencia y prevalencia de la enfermedad arterial obstructiva crónica (EAOC) de las extremidades inferiores. *Rev. Col. Cirug. Vasc.* 9(2): 15-20.

Mense S. (2009). Algesic agents exciting muscle nociceptors *Exp. Brain. Res.* Jun; 196(1): 89-100.

Millar, N.C., Homsher, E. (1990). The effect of phosphate and calcium on force generation in glycerinated rabbit skeletal muscle fibers: a steady-state and transient kinetic study. *J. Biol. Chem.* 265: 20234– 20240.

Moore, R.L., Stull, J.T. (1984). Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscles in situ. *Am. J. Physiol.* 247: 462-471.

Moss, R.L., Diffie, G.M., Greaser, M.L. (1995). Contractile properties of skeletal muscle fibres in relation to myofibrillar protein isoforms. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 126: 2-63.

Murphy, R.M., Larkins, N.T., Mollica, J.P., Beard, N.A., Lamb, G.D. (2009). Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca^{2+} storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. *J. Physiol.* 15(587- Pt 2): 443-60.

Nielsen JJ, Kristensen M, Hellsten Y, Bangsbo J, Juel C. (2003). Localization and function of ATP-sensitive potassium channels in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284(2): R558-563.

Pan, Z., Yang, D., Nagaraj, R.Y., Nosek, T.A., Nishi, M., Takeshima, H., Cheng, H., Ma, J. (2002). Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking $\text{mg}29$. *Nat. Cell. Biol.* 4: 379–383.

Piper, H.M., Abdallah, Y., Schäfer, C. (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61(3): 365– 371

Pipinos, I.I., Judge, A.R., Selsby, J.T., Zhu, Z., Swanson, S.A., Nella, A.A., Dodd, S.L. (2007). The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction. *Vasc. Endovascular Surg.* 41(6): 481-489.

Pipinos, I.I., Judge, A.R., Selsby, J.T., Zhu, Z., Swanson, S.A., Nella, A.A., Dodd, S.L. (2008). The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 2. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber type. *Vasc. Endovascular Surg.* 42(2): 101-112.

Posterino, G.S., Dunn, S.L. (2008). Comparison of the effects of inorganic phosphate on caffeine-induced Ca^{2+} release in fast- and slow-twitch mammalian skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 294: C97-C105.

Rácz, I.B., Sarkadi, L., Hamar, J. (1996). The functional damages of ischemic/reperfused skeletal muscle. *Acta Physiol. Hung.* 84: 205-216.

Rodrigues Ade, C., Silva, M. dal D., Pai, V.D. (1994). Distribution of different fibre types of M. extensor carpi radialis longus of the rat. *Anat. Histol. Embryol.* 23(4): 352-356.

Rubin, B.B., Romaschin, A., Walker, P.M., Gute, D.C., Korthuis, R.J. (1996) Mechanisms of postischemic injury in skeletal muscle: intervention strategies. *J. Appl. Physiol.* 80(2): 369-387.

Ryuzo, N., Tomoyuki, M., Tomoyuki, I., Kunihiro, N. (1997). Inhibition of Sarcolemmal Na, K ATPase Activity Reduces the Infarct Size Limiting Effect of Preconditioning in Rabbit Hearts. *Circulation.* 96: 599-604.

Schellong, S.M., Ockert, D., Zimmermann, T. (1998) Pathophysiology and clinical aspects of ischemia-reperfusion damage to skeletal muscles. *Vasa* 27(4): 207-15.

Schiaffino, S., Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* 76: 371-423.

Schoen, M., Rotter, R., Gierer, P., Gradl, G., Strauss, U., Jonas, L., Mittlmeier, T., Vollmar, B. (2007). Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia. *J. Trauma* 63(4): 788 –797.

Soukup, T., Zacharová, G., Smerdu, V. (2002). Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem.* 104(4): 399–405.

Stephenson, D.G., Lamb, G.D., Stephenson, G.M. (1998). Events of the excitation contraction relaxation (E-C-R) cycle in fast and slow twitch mammalian muscle fibres relevant to muscle fatigue. *Acta Physiol. Scand.* 162: 229-245.

Sternbergh III, C.W., Adelman, B. (1992). Skeletal muscle fiber type does not predict sensitivity to postischemic damage. *J. Surg. Res.* 53: 535-541.

Stiber, J., Hawkins, A., Zhang, Z.S., Wang, S., Burch, J., Graham, V., Ward, C.C., Seth, M., Finch, E., Malouf, N., Williams, R.S., Eu, J.P., Rosenberg, P. (2008). STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 10: 688–697.

Sweeney, H.L., Bowman, B.F., Stull, J.T. (1993). Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am. J. Physiol.* 264: 1085-1095.

Tsai, Y.L., Hou, C.W., Liao, Y.H., Chen, C.Y., Lin, F.C., Lee, W.C., Chow, S.W., Kuo C.H. (2006). Exercise training exacerbates tourniquet ischemia-induced decreases in GLUT4 expression and muscle atrophy in rats. *Life Sci.* 78: 2953–59.

Tupling, R., Green, H., Senisterra, G., Lepock, J., McKee, N. (2001). Ischemia-induced structural change in SR Ca^{2+} ATPase is associated with reduced enzyme activity in rat muscle. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 281: 1681–1688.

Tupling, A.R. (2009) The decay phase of Ca^{2+} transients in skeletal muscle: regulation and physiology. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 34(3): 373-376.

Tupling, R., Green, H., Senisterra, G., Lepock, J., McKee, N. (2001). Ischemia-induced structural change in SR Ca^{2+} -ATPase is associated with reduced enzyme activity in rat muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281: R1681-R1688.

Turchányi, B., Tóth, B., Rácz, I., Vendégh, Z., Furész, J., Hamar, J. (2005). Ischemia reperfusion injury of the skeletal muscle after selective deafferentation. *Physiol. Res.* 54(1): 25-32.

Vandenborne, W.G., McCully, K., Leigh, K. (1997). Noninvasive measurement of phosphocreatine recovery kinetics in single human muscles. *Am. J. Physiol.* 272: 525-534.

Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van, S.M., Debaix H., Gailly, P. (2002). Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* 158: 1089–1096.

Vázquez-García, M., Reyes-Guerrero, G. (2009). Three types of single voltage-dependent potassium channels in the sarcolemma of frog skeletal muscle. *J. Membr. Biol.* 228(1):51-62.

Walters, T.J., Kragh, J.F., Baer, D.G. (2008). Influence of fiber-type composition on recovery from tourniquet induced skeletal muscle ischemia reperfusion injury. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 33: 272–281.

Wood, S.J., Slater, C.R. (1997). The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast and slow twitch muscles. *J. Physiol.* 500: 165-176.

Woitaske, M.D., McCarter, R.J. (1998). Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Plast. Reconstr. Surg.* 102(6): 2052-2063.

Wolosker, H., Rocha, J.B., Engelender, S., Panizzutti, R., De Miranda, J., De Meis, L. (1997). Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase isoforms: diverse responses to acidosis. *Biochem. J.* 321: 545–550.

Yang, T., Allen, P.D., Pessah, I.N., Lopez, J.R. (2007). Enhanced excitation-coupled calcium entry in myotubes is associated with expression of RyR1 malignant hyperthermia mutations. *J. Biol. Chem.* 282: 37471–37478.

Zhao, X., Yoshida, M., Brotto, L., Takeshima, H., Weisleder, N., Hirata, Y., Nosek, T.M., Ma, J., Brotto, M. (2005). Enhanced resistance to fatigue and altered calcium handling properties of sarcalumenin knockout mice. *Physiol. Genomics* 23: 72–78.

Zhao, X., Weisleder, N., Han, X., Pan, Z., Parness, J., Brotto, M., Ma, J. (2006). Azumolene inhibits a component of store-operated calcium entry coupled to the skeletal muscle ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 281: 33477–33486.

Zhao, X., Weisleder, N., Thornton, A., Oppong, Y., Campbell, R., Ma, J., Brotto, M. (2008). Compromised store-operated Ca²⁺ entry in aged skeletal muscle. *Aging Cell* 7: 561–568.