

Efecto de la curcumina en parámetros de función en músculos oxidativo y glucolítico en un modelo de isquemia reperfusión muscular en ratas Wistar.

Natalia Jiménez Cardozo

Trabajo de investigación para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas

DIRECTOR

Camilo Morales Jiménez, MSc.

Co- Directora

Magda Carolina Díaz, MSc

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS

SANTIAGO DE CALI - 2016

|

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Cali, Junio de 2016

*Dedicado a nuestros biomodelos: Ellos han
dado su vida a cambio de estas modestas
conclusiones.*

Índice

1. Resumen	7
2. Introducción	9
3. Objetivos	11
3.1 Objetivo general.....	11
3.2 Objetivos específicos	11
4. Marco teórico	12
4.1 La lesión por isquemia reperusión	12
4.1.1 El papel de los radicales libres de oxígeno en la lesión por isquemia reperusión	13
4.1.2 Cambios metabólicos durante la lesión por isquemia reperusión.....	16
4.2 Mecanismos de lesión de los radicales libres de oxígeno producidos durante la isquemia reperusión sobre el músculo esquelético.....	17
4.3 Respuesta funcional del músculo esquelético a la isquemia y a la isquemia reperusión	23
4.4 Curcumina	26
4.4.1 Propiedades farmacológicas descritas para curcumina.....	26
4.4.2 Aspectos farmacocinéticos de la curcumina	29
4.4.3 Acción de la curcumina sobre la lesión de isquemia reperusión en músculo esquelético.....	33
5. Materiales y metodología	37
6. Resultados	50
6.1 Efecto de la curcumina en los parámetros funcionales del músculo extensor radial del carpo	50
6.2 Efecto de la curcumina en parámetros funcionales del músculo soleo	63

6.3 Comparación de los efectos de la curcumina en los parámetros funcionales entre el músculos soleo y el extensor radial del carpo	74
7. Discusión.....	77
8. Conclusión y perspectivas.....	88
9. Bibliografía	90
10. Anexos	96

1. Resumen

Existe en la clínica, una gran variedad de lesiones del músculo esquelético secundarias al traumatismo mediado por isquemia-reperfusión como la enfermedad arterial periférica oclusiva, la oclusión vascular aguda seguida de revascularización durante procedimientos quirúrgicos y durante el trabajo muscular concéntrico de alta intensiva, encontrándose en todas éstas, como consecuencia de la lesión por isquemia reperfusión, tanto dolor muscular como pérdida de la fuerza. Utilizando modelos animales se ha observado que la pérdida 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.

De otro lado, existe evidencia experimental de que la utilización de curcumina, el compuesto activo encontrado en los rizomas de *curcuma longa*, una planta herbácea de la familia de las zingiberáceas, atenúa los efectos de la lesión por isquemia reperfusión en diversos tejidos, incluido el músculo esquelético, encontrándose que tras su administración hay aumento de la funcionalidad de órganos y sistemas, además de disminución de marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo tanto a nivel sérico como tisular, así como aumento de la expresión y/o actividad de enzimas antioxidantes en los tejidos afectados por la lesión por isquemia reperfusión.

En vista de la evidencia creciente en la literatura médica del efecto benéfico del uso de curcumina como antiinflamatorio/antioxidante y dado que para el caso particular de la lesión por isquemia reperfusión en músculo esquelético únicamente se encuentran reportados los efectos sobre marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo tras la administración de curcumina, se llevo a cabo un estudio experimental en ratas wistar

machos adultos (grupo control, grupo isquemia-reperfusión, grupo isquemia- perfusión dimetil sulfóxido y grupo isquemia- perfusión curcumina intraperitoneal 100 mg/kg) con períodos de perfusión de uno, tres y siete días y se evaluó la función muscular (sacudida simple, tensión tetánica y fatiga) de músculos de predominio oxidativo (soleo) y glucolítico (extensor radial del carpo), encontrándose que en el músculo de predominio glucolítico no hubo diferencias entre el grupo que recibió tratamiento con curcumina y los demás grupos experimentales, mientras que para el músculo de predominio oxidativo se encontró mejoría en la fuerza desarrollada tras la estimulación tetánica en comparación con los grupos experimentales que no recibieron manejo con curcumina a los tres días de perfusión. En conclusión podemos decir que la aplicación intraperitoneal de curcumina en la lesión de isquemia-reperfusión acelera la recuperación funcional en el músculo oxidativo pero no presenta efectos en la recuperación funcional en el músculo glucolítico.

Palabras clave: músculo esquelético, isquemia, perfusión, curcumina, función muscular músculos oxidativos, músculos glucolíticos, modelos animales

2. Introducción

En medicina ocupacional y deportiva, las lesiones del músculo esquelético son responsables de la mayoría de limitaciones funcionales observadas [1]; un lugar importante tienen dentro de este tipo de lesión, la lesión muscular secundaria al traumatismo mediado por isquemia-reperfusión, que puede evidenciarse en una variedad de situaciones clínicas tales como: **(i)** En enfermedad arterial periférica oclusiva [2] [3], que se considera a nivel mundial puede afectar entre un 15 y un 20% de los sujetos mayores de 70 años [4], **(ii)** En situaciones quirúrgicas como la oclusión vascular aguda seguida de revascularización (en cirugía vascular electiva), en cirugía ortopédica que implica la utilización de torniquete y durante los trasplantes que contienen tejido muscular esquelético [5] y **(iii)** Trauma muscular directo que comprometa el sistema vascular.

Dos rasgos comunes en los que suelen derivar esta variedad de situaciones clínicas son el dolor muscular agudo y la pérdida temporal de la función muscular. [6], [2], [3], [5]

Dentro del grupo de agentes usados como protectores en lesión por isquemia reperusión en diversos tejidos, se encuentra la curcumina (1,7-bis-[3-methoxy-4-hydroxyphenyl]-1,6-heptadiene-3,5-dione), derivada de la rizoma de *Curcuma Longa*, miembro de la familia del jengibre

Existe evidencia acerca de una gran variedad de propiedades medicinales de curcumina: antiproliferativa, antibacterial, antioxidante y antiinflamatoria, siendo estas dos últimas de gran importancia en el tratamiento de la lesión por isquemia reperusión [7], [8], [9]

En el caso particular de la lesión de músculo esquelético por isquemia reperusión en una población de ratas Wistar adultas, se demostró que la administración intraperitoneal de cúrcuma disminuye niveles plasmáticos de las citoquinas proinflamatorias factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) e interleuquina 1b (IL-1b) y aumenta la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) [10]. Otro efecto importante que se ha descrito en el músculo esquelético es el favorecimiento de la recuperación muscular post inmovilización, esto a través del incremento de la expresión de proteínas anti apoptóticas [11].

Considerando: (i) que la utilización de modelos animales en estudios de lesión muscular es validada por todos los aspectos éticos que impiden adelantarlos directamente en humanos; (ii) que los procesos de isquemia reperusión en músculo esquelético son de gran importancia clínica; (iii) que es de relevancia clínica conocer si la curcumina de forma aislada puede minimizar los daños en la lesión de isquemia reperusión y (i) que no se conoce si la curcumina administrada previa al proceso de reperusión presenta efectos en la función muscular de músculos oxidativo y glucolítico en un modelo animal seguida de un proceso de isquemia reperusión, se pretende con este proyecto de investigación, describir los efectos de la aplicación de curcumina en la función muscular de dos grupos musculares (oxidativos y glucolíticos) que han sufrido isquemia por 120 minutos y reperusión en ratas Wistar adultas.

Concretamente, proponemos contestar la siguiente pregunta:

¿Cómo se modifica la función muscular después de haber sufrido lesión inducida por 120 minutos de isquemia seguidas por reperusión, cuando se aplica curcumina antes del proceso de reperusión, en el músculo soleo (oxidativo) y en el músculo extensor radial del carpo (glucolítico) de ratas Wistar adultas?

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Caracterizar los efectos inducidos por el uso de curcumina en los parámetros de función en músculos oxidativo y glucolítico en un modelo de isquemia-reperfusión en ratas Wistar adultas.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar los efectos inducidos por el uso de curcumina sobre la sacudida simple en músculos oxidativo y glucolítico en un modelo de isquemia-reperfusión en ratas Wistar adultas.
- Identificar los efectos inducidos por el uso de curcumina en la tensión tetánica en músculos oxidativo y glucolítico en un modelo de isquemia-reperfusión en ratas Wistar adultas.
- Caracterizar los efectos inducidos por el uso de curcumina en los índices de fatiga en músculos oxidativo y glucolítico en un modelo de isquemia-reperfusión en ratas Wistar adultas.

4. Marco Teórico

4.1 La lesión por isquemia-reperfusion

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 [12]. La causa más frecuente es una obstrucción arterial, aunque también puede darse por insuficiencia circulatoria periférica [12]. 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 o cuando predomina el componente fibroso puede producir una estenosis por retracción de los tejidos [12]. 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: (a) la duración, (b) la intensidad de la isquemia, (c) la rapidez con que se instala, (d) el grado de sensibilidad de los tejidos y (e) la disposición anatómica del árbol vascular [12].

En términos de duración, la isquemia puede ser transitoria o persistente [12]. La intensidad depende del grado de obstrucción arterial y puede ser absoluta en caso de oclusión total o isquemia relativa en caso de obstrucción parcial [13]. En general, los

infartos son consecuencia de una isquemia por oclusión [12]. La isquemia aguda es normalmente más grave que la crónica [12]. Cuando se produce crónicamente puede permitir el desarrollo de colaterales y de anastomosis [12]. En cuanto a su sensibilidad, las células muestran diferentes tiempos de sobrevida a la isquemia. Las neuronas mueren luego de 5 minutos, los miocitos cardiacos pueden resistir hasta 30 minutos, las células renales hasta 1 hora y las células musculares esqueléticas entre 3 y 6 horas [12] [14]. 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 [13]. 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 [12]. 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) [12]. 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 [12].

Se conoce que el daño se debe en parte a la respuesta inflamatoria que se produce en los tejidos afectados por la isquemia [15]. Los leucocitos que entran al tejido durante la reperusión liberan interleuquinas y radicales libres (hidroxilo $\text{HO}\cdot$, superóxido O_2^- , entre otros) en respuesta al daño tisular producido por la isquemia [15].

4.1.1 El papel de los radicales libres de oxígeno en la lesión por isquemia reperusión

Resulta importante para el propósito particular del presente trabajo, dado que la curcumina (agente terapéutico utilizado experimentalmente) tiene amplia evidencia de tener propiedades antioxidantes, profundizar en los mecanismos de lesión celular inducidos por los radicales libres de oxígeno (ROS) en la lesión de isquemia reperusión en músculo esquelético.

Como se ha mencionado, la reentrada de sangre oxigenada al tejido isquémico, aunque necesaria para la restauración de la producción aeróbica de ATP, también genera radicales libres de oxígeno (ROS). Por su naturaleza altamente reactiva, los ROS generados tras la reperusión pueden modificar oxidativamente virtualmente todas las biomoléculas dentro de las células, generando paradójicamente disfunción celular tras el ingreso de oxígeno (paradoja del oxígeno) [16].

Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) moléculas derivadas de óxido nítrico son también importantes y de hecho, al interacción entre ROS y las especies reactivas de nitrógeno (NOS) genera especies reactivas nitrógeno oxidadas (RNOS) tales como el fuerte prooxidante peroxinitrito ONOO^- [17].

Los efectos de los RNOS incluyen, daño y modificación a macromoléculas, inducción de muerte de células endoteliales o parenquimatosas en el tejido afectado por la isquemia, estimulación de producción y liberación de mediadores inflamatorios en varios tipos celulares, así como inducción de moléculas de adhesión que promueven las uniones e interacciones entre leucocitos y linfocitos al endotelio, y también disminución de la disponibilidad de óxido nítrico protector [17].

Se reconocen tres grandes componentes involucrados en la lesión por estrés oxidativo: Primero, los efectos indirectos de los oxidantes, especialmente de los oxidantes no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediados por la disfunción en los

mecanismos de control y señalización celular que son sensibles a cambios en los circuitos tiol- redox [17]; segundo, los efectos moduladores sobre la señalización celular de forma directa a través de modificaciones covalentes, oxidativas o nitrosativas de proteínas claves para la regulación [17] y por último, el daño directo por RNOS, especialmente por radicales oxidantes a las moléculas celulares como proteínas, lípidos y carbohidratos. No se tiene claridad respecto a cuál de las mencionadas juega un papel especial en aspectos particulares de la I/R [17].

El ROS inicialmente producido durante la I/R es el O_2^- , generado por la reducción univalente del oxígeno molecular. El O_2^- , es el oxidante primario, puesto que todos los demás ROS son derivados de su dismutación o interacción con otras especies reactivas y su producción deriva de enzimas citoplasmáticas y de membrana, así como de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria [17]. El O_2^- , puede oxidar directamente varias biomoléculas y activar enzimas con centro de hierro sulfuro como las aconitasas, fumarasas, NADH deshidrogenasas, creatin quinasas y calcineurinas [17].

Sin embargo, el superóxido no se cree tan tóxico in vivo, dada su rápida y espontánea dismutación a H_2O_2 , una conversión acelerada por la superóxido dismutasa (SOD) [17].

Sin embargo, el anion superóxido puede convertirse a su ácido conjugado, el oxidante más potente radical de hidroperoxilo, particularmente en bajo pH como lo que pasa en isquemia. Aunque el H_2O_2 es menos reactivo que el O_2^- , puede difundir a través de las membranas y actuar como segundo mensajero y modulador de la señalización celular. El O_2^- puede reaccionar con el óxido nítrico (NO) para formar anión peroxinitrito, que a su vez puede protonarse a ácido peroxinitrito que es muy citotóxico [17].

Los principales recursos para la producción de ROS en la célula son: la mitocondria, la xantina oxidasa (XO), la NADPH oxidasa, las citocromo P450 oxidasas y la óxido nítrico sintasa (NOS). Se desconoce el rol preciso de cada uno de estos en la lesión por I/R [17].

De todos estos, se considera a la mitocondria como el más grande recurso de O_2^- intracelular. Más del 90% del oxígeno que ingresa a las células se reduce a agua gracias a la mitocondria [17]. En condiciones fisiológicas, un porcentaje del oxígeno se reduce a O_2^- por el llamado "escape de electrones" en dos sitios específicos en la cadena de electrones: NADH ubiquinona oxidoreductasa (complejo I) y la ubiquinona/citocromo c reductasa (complejo III). La producción de ROS por parte de la mitocondria se incrementa significativamente en la lesión por I/R, observándose además disminución significativa de la capacidad antioxidante mitocondrial [17].

La muerte de nuevas células induce la liberación de más radicales libres [12]. La inflamación, si se vuelve crónica, puede finalmente reproducir la isquemia, por extravasación de fluidos (edema o tumor) y estasis sanguíneo (aumento de la viscosidad) [12]. Adicionalmente, en el músculo cardíaco, se ha observado que en los primeros 5 a 15 minutos de reperfusión, se desarrolla una hiper-contractura, la cual tiende a favorecer la lesión de las células cardíacas durante la etapa de reperfusión [18].

4.1.2 Cambios metabólicos durante la lesión por isquemia reperfusión.

Durante la isquemia hay una disminución del aporte de oxígeno y de glucosa a los tejidos afectados [12]. Este proceso tiene como consecuencia la reducción gradual de los depósitos energéticos intracelulares y el aumento del metabolismo anaeróbico [13].

A nivel celular el traumatismo por isquemia-reperfusión se ha descrito que puede llevar a procesos de daño de la membrana celular, edema, disfunción microvascular y necrosis, lo cual está asociado en el caso particular de las células musculares, con procesos de morbilidad y disfunción definitiva del tejido muscular. [12] [19]. Por ser de interés para el presente trabajo, es importante resaltar que en músculo esquelético, a nivel metabólico se ha descrito una reducción gradual de los depósitos energéticos intracelulares de glucógeno, con aumentos en las concentraciones intracelulares de hidrogeniones y de lactato [6], [13] y por esta razón, hay una disminución del pH citosólico. En un intento por restablecer el pH normal, la célula realiza un intercambio de H^+ por sodio, vía intercambiador Na^+/H^+ [17]. Los iones de Na^+ son, a su vez, intercambiados por Ca^{++} por el intercambiador Na^+/Ca^{++} . Además, de la pobre capacidad de control de las concentraciones de calcio al interior del plasmalema, los depósitos de calcio al interior del retículo sarcoplásmico también se afectan durante la I/R [17]. En particular, la recaptura de calcio dentro del retículo sarcoplásmico por la SERCA ATPasa se afecta-, dado que por la isquemia se ha depletado significativamente el ATP y por incrementos de la concentración de protones, mientras que la liberación de calcio por los receptores de rianodina está aumentada [17].

En la lesión por isquemia-reperfusión así mismo, se ha reportado que induce en el músculo esquelético condiciones de hipoxia, hipercapnia y acumulación a nivel extracelular de metabolitos como adenosina, protones, lactato, hipoxantina y colina, entre otros [6], [17], [20].

4.2 Mecanismos de lesión de los ROS producidos durante la isquemia reperusión sobre el músculo esquelético

Durante la década de los 70 hubo muchos reportes de daño al músculo esquelético in vitro por los ROS generados durante la contracción, concentrándose en el rol del influjo excesivo de calcio. Desde la década de los 80 se señaló que las contracciones musculares que más daño producían al músculo esquelético son las excéntricas, donde posteriormente se observa infiltrado de células fagocíticas y neutrófilos, asociada a una gran pérdida de la función muscular, observándose también que esta fase podía atenuarse con la administración previa de antioxidantes [21]. Existe evidencia considerable de que durante el ejercicio aeróbico contráctil del músculo esquelético, la generación de ROS está limitada durante las contracciones, aumentando sólo de 2 a 4 veces durante las contracciones [21]. Se ha evidenciado que las NADPH oxidasas asociadas al retículo sarcoplásmico generan superóxidos que influyen al retículo sarcoplásmico para que libere calcio gracias a que pueden oxidar el receptor de rianodina. La fosfolipasa A2 (PLA₂) es un recurso de ROS (sobre todo la isoforma calcio independiente en reposo y la calcio dependiente durante las contracciones) y esta PLA₂ puede contribuir tanto a la formación de ROS mitocondriales y a la liberación extracelular de superóxido a través de un sistema dependiente de la 5-LOX [21].

Resulta importante recordar que las fibras musculares agrupadas en fibras tipo I o lentas (abundantes en músculo de metabolismo oxidativo) y tipo II o rápidas (abundantes en músculo de metabolismo glucolítico), presentan diferencias importantes frente a su vulnerabilidad ante la isquemia. Las fibras tipo I tienen predominantemente metabolismo oxidativo de triglicéridos como fuente energética y por esto son mucho más vulnerables a la falta de oxígeno, mientras que las fibras blancas o tipo II, tienen predominantemente metabolismo anaeróbico, siendo el glucógeno su principal fuente de energía [22].

Ante el estrés oxidativo descrito previamente, ocasionado por la isquemia reperusión, existe evidencia de que la liberación de H_2O_2 es de dos a tres veces mayor desde la mitocondria en músculo glucolítico, con mayor fuga de radicales libres (3,5 veces más) desde sus mitocondrias vs. El músculo oxidativo [23].

Mediciones directas en fibras musculares permeables han mostrado que la capacidad antioxidante de la mitocondria de músculo rico en fibras tipo II, particularmente sobre de H_2O_2 exógeno, es aproximadamente 40-50% menor en comparación con las mitocondrias de fibras lentas [23]. Adicionalmente, la actividad de enzimas antioxidantes es significativamente menor en músculo glucolítico que en el oxidativo, especialmente para glutathion peroxidasa (88% menos actividad en músculo glucolítico vs oxidativo) [23].

Además de los mecanismos de lesión descritos para los ROS, es importante recordar que estos radicales tienen también una importante función como moléculas moduladoras de señales que permiten la adaptación del músculo esquelético a condiciones incluso antagónicas, como lo son el ejercicio físico y la atrofia por inactividad [24]. Se ha observado que un incremento moderado en la producción de ROS en músculo esquelético, durante un período corto de tiempo (minutos) puede activar vías señalizadoras que derivan en adaptación celular y protección en contra de estrés futuro[24]. En contraste, la producción de altos niveles de ROS en períodos largos de tiempo (horas) puede derivar en activación crónica de vías señalizadoras que promueven proteolisis y potencialmente muerte celular [24]. También hay amplia evidencia de que la señalización redox puede influenciar varios factores de transcripción, llevando a una alteración de la expresión genética y cambios fenotípicos en el músculo esquelético [24]. En general, el mecanismo mejor descrito de la señalización redox para controlar la expresión génica, es a través del estatus de

fosforilación de factores activadores de la transcripción [24]. De hecho, los ROS juegan un importante papel en controlar la actividad de varias quinasas y fosfatasas [24]. Además, los ROS pueden activar el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, más conocido como NFkB (factor que codifica para varias proteínas pro inflamatorias) [24]. Tal como se aprecia en la **figura 1**, tanto quinasas como fosfatasas son sensibles a ser modificadas por ROS; dentro de las quinasas susceptibles a ser reguladas por los ROS en músculo esquelético, está la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que tienen un rol central por el control que ejerce de varias vías señalizadoras vía activación o inactivación de proteínas reguladoras a través de la fosforilación. Las tres subfamilias de las MAPK mejor caracterizadas en células eucariotas son las quinasas c-Jun N terminal (JNK), la p38MAPK y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) [24] y dentro de las fosfatasas se conoce que las fosfatasas serina/treonina contienen iones de metales que son susceptibles a la oxidación, un ejemplo de estas fosfatasas es la calcineurina, que defosforila al factor nuclear de células T activadas, más conocido como NFAT, permitiéndole a éste traslocarse al núcleo y aumentar la expresión de genes que contribuyen a la hipertrofia muscular [24]; de oxidarse la calcineurina no podría activarse NFAT. También hay evidencia de que los inhibidores de las serina/treonina fosfatasas pueden activar al factor NFkB. Las fosfotirosin fosfatasas también son susceptibles a la activación inducida por oxidación [24].

Un posible mecanismo que une el estrés oxidativo con la sobrecarga de calcio evidenciada en las células musculares, es la formación de aldehídos reactivos mediada por ROS. Estos aldehídos pueden inhibir la SERCA ATPasa y con esto se acumularía el calcio al interior de la célula. Este mecanismo media en parte, la sobrecarga de calcio observada en el músculo esquelético inactivo por largos períodos de tiempo [25].

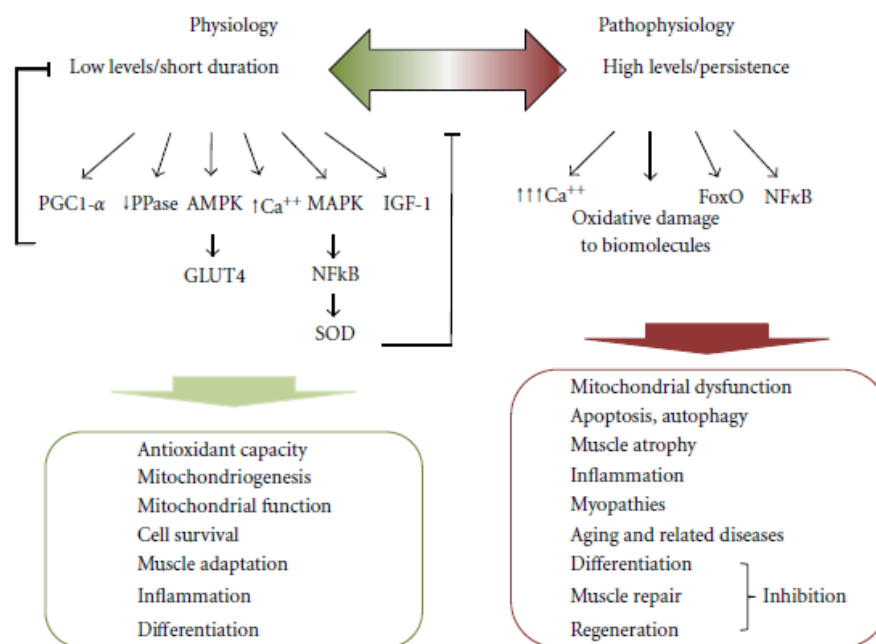


Figura 1. Acciones de las especies reactivas de oxígeno sobre el músculo esquelético en los escenarios fisiológico y patológico, tomado de referencia [26]. En el escenario fisiológico (p. ej. durante el entrenamiento físico) en donde hay formación de ROS en bajas cantidades y por un corto tiempo de duración, los ROS modulan gran variedad de sistemas de señalización dando como resultado una mejor adaptación aumentando la capacidad antioxidante, la biogénesis y función mitocondrial, la supervivencia y la diferenciación celular entre otras. En el escenario patológico, cuando la producción de ROS es mayor y sostenida en el tiempo (p. ej. en largos períodos de inactividad física), los ROS también juegan un importante papel en la adaptación del músculo a esta condición, evidenciándose disfunción mitocondrial, inflamación, inhibición de la reparación y regeneración muscular, autofagia y muerte por apoptosis, entre otros fenómenos. **PGC-1α:** Coactivador alfa 1 del receptor gamma proliferador activado de peroxisomas, **PPase:** Fosforilasas, **AMPK:** Proteínas quinasas activadas por AMP, **GLUT4:** Transportador de glucosa tipo 4, Ca^{++} : Calcio, **MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos, **NFκB:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, **SOD:** Superóxido dismutasa, **IGF-1:** Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, **FoxO:** Factores de transcripción de la familia Forkhead Box 1.

Se entiende entonces que pese a que existen mecanismos definidos de lesión de los ROS sobre el músculo esquelético, también son los ROS (en bajas cantidades y por períodos cortos de tiempo) responsables de la adaptación del músculo esquelético a condiciones como el ejercicio físico.

Durante la contracción muscular, hay un aumento de la producción de ROS en citosol, pese a una discreta señal mitocondrial, entendiéndose que los recursos no mitocondriales de ROS, como la XO y la NOS, podrían jugar un papel importante en las señales intracelulares mediadas por ROS. Existe evidencia de la contribución de la iNOS2 a la producción de ROS después de la despolarización. [27]

La acción de los ROS y los NOS está asociada en músculo esquelético a la oxidación de sitios redox sensibles [28], que tienen impacto sobre el desarrollo de la fuerza muscular, como puede apreciarse en la **figura 2**. Además de afectar la regulación de calcio y/o la función de los microfilamentos, el óxido nítrico puede impactar la producción de fuerza al disminuir la producción de ATP, puntualmente la isoforma NOS3 -de la mitocondria de músculo esquelético- y la producción de óxido nítrico asociada a ésta, puede disminuir producción de ATP mitocondrial vía inhibición de la citocromo oxidasa u otras enzimas mitocondriales [28]. Los productos derivados del óxido nítrico pueden también inhibir la actividad tanto de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y creatin quinasa, que a su vez también limitan la producción

También existe evidencia de que aumentando Guanosín Monofosfato cíclico (GMPc), a través de aumento de óxido nítrico por ejemplo, se reduce la producción de fuerza por parte del músculo [28].

El canal receptor de rianodina para la liberación de calcio (RyR), en el retículo sarcoplásmico, está compuesto de subunidades que contienen grupos sulfhidrilos que son sensibles a la modulación redox [28]. Al exponerse a ROS exógenos, existe evidencia de que las proteínas reguladoras de RyR, se oxidan, observándose que ante altos niveles de ROS, se aumenta la probabilidad de abrir los canales de RyR,

resultando en una mayor liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico, encontrándose un efecto opuesto para los antioxidantes [28].

Existe además evidencia que altos niveles de ROS pueden inhibir la SERCA ATPasa [28]. Respecto a las proteínas contráctiles, existe evidencia de que los altos niveles de ROS pueden alterar la estructura de los miofilamentos y disminuir su sensibilidad al calcio, también los ROS pueden alterar la cinética de los puentes cruzados y pueden potenciar la insensibilidad creciente al calcio de la fatiga muscular [28].

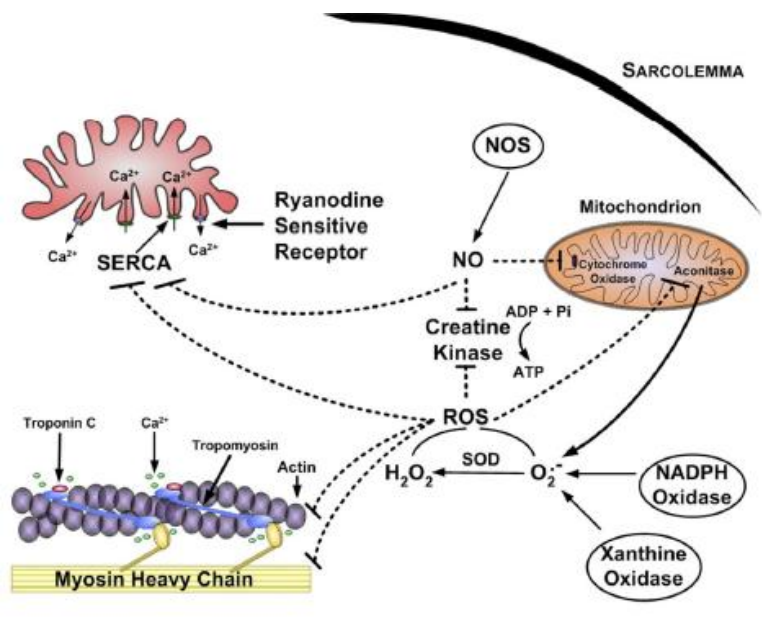


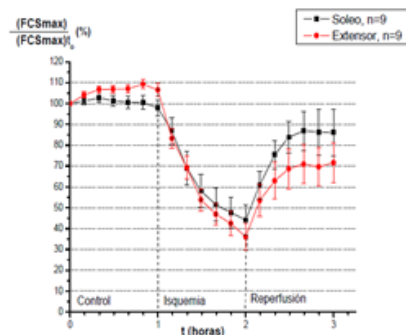
Figura 2. Blancos Redox sensibles que pueden afectar el desarrollo de la fuerza muscular. SOD: superóxido dismutasa, NOS: óxido nítrico sintasa, NO: óxido nítrico, SERCA: calcio ATPasa de retículo sarcoplásmico. Tomado de referencia [28].

Se tiene entonces que existen varios blancos redox sensibles en el músculo esquelético, que pueden ser modificados por la presencia de ROS y pueden finalmente afectar el desarrollo de la fuerza muscular.

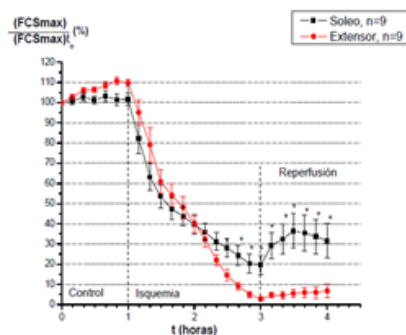
4.3 Respuesta funcional del músculo esquelético a la isquemia y a la isquemia reperfusión

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) como el músculo extensor largo de los dedos (mayor predominio de fibras tipo II) presentan una caída de la tensión alrededor de un 60% de la tensión en la primera hora de isquemia, la cual se recupera alrededor de un 40% durante la primera hora de reperfusión como se observa en la **figura 3a** [29] [6]. Las diferencias observadas entre ambos grupos musculares aparecen en la segunda hora de isquemia, en donde las caídas de la fuerza máxima de sacudida simple son mayores en el músculo extensor (alrededor del 95%) mientras que el músculo oxidativo oscila entre un 80%, estas diferencias entre ambos grupos musculares se mantiene durante el proceso de reperfusión, encontrándose una recuperación alrededor de un 20% de la fuerza en el músculo soleo y un 5% en el músculo extensor, ya en la tercera hora de isquemia se observa que el músculo oxidativo su fuerza oscila en un 10% y el músculo glucolítico ya no presenta fuerza, en ambos casos no se recupera la fuerza muscular con la reperfusión como se observa en la **figura 3c**.

A.



B.



C.

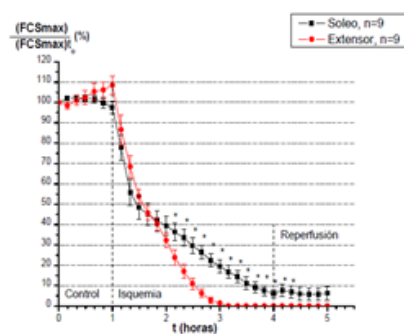


Figura 3. Comparación de la fuerza máxima de la contracción (F_{CSmax}) normalizada a tiempo cero en función del tiempo de isquemia -reperusión entre músculo soleo y ERLC. A) músculo soleo a 1 horas de isquemia y 1 hora de reperusión (■), y músculo extensor a 1 hora de isquemia y 1 hora de reperusión (●). 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, $p < 0.05$).

En otro estudio realizado en ratones [30], se evaluó el efecto del tiempo de reperusión luego de tres horas de isquemia, comparando el músculo soleo (oxidativo) y el músculo extensor digital longo (glucolítico). Se encontró que la fuerza en la sacudida simple de ambos músculos se recupera aproximadamente en un 10% a los tres días luego de iniciada la reperusión, en un 50% para el músculo soleo y en un 30% para el músculo extensor digital longo después de 7 días de reperusión, y en un 70% para ambos músculos después de tres y siete días de reperusión [30].

Otro estudio en el que se analizó la recuperación de la tensión tetánica en músculos con diferentes tipos de fibras musculares en proceso de isquemia de 4 horas concluyó que 14 días de perfusión el músculo oxidativo (soleo) presentaba una recuperación del 70% mientras que el músculo glucolítico (plantar) solo se recupera un 30%, por lo cual concluye que los músculos con predominio oxidativo la recuperación de la fuerza máxima es significativamente mejor [31].

Se ha planteado que la respuesta funcional del músculo ante la isquemia reperusión, se correlaciona con la producción de ROS, aceptándose desde 1992 las conclusiones experimentales de Reid y colaboradores obtenidas de diafragma de ratas: a) los intermediarios reactivos de oxígeno están presentes en fascículos de fibras musculares aislados de diafragma (como también en músculo esquelético de extremidades) aún en condiciones fisiológicas como ya se había planteado, b) la estimulación repetitiva aumenta las concentraciones de ROS en miocitos, c) Los intermediarios reactivos de oxígeno dentro del músculo promueven fatiga muscular y d) Los efectos antioxidantes son más pronunciados a mayor fatiga [32].

Pese a que estos ROS se propone, incrementan su concentración en músculo esquelético durante la reperusión, existe evidencia de que su aparición puede ser muy temprana, durante la hipoxia ocasionada por la isquemia, pudiendo ser este un mecanismo de preacondicionamiento y protección ante isquemias posteriores, similar a lo descrito para el músculo cardíaco [33].

4.4 Curcumina

4.4.1 Propiedades farmacológicas descritas para la curcumina

Miembro de la familia de los polifenoles, la curcumina (1,7-bis-[3-methoxy-4-hydroxyphenyl]-1,6-heptadiene-3,5-dione), derivada de la raíz *Curcuma Longa*, funciona como un inhibidor de NF-kB y se ha utilizado durante años como especia y como preservante de comidas; sus efectos colaterales son mínimos y se ha administrado a sujetos humanos de forma segura durante años [34]. En la última década, cerca de 200 artículos concernientes a los efectos de la curcumina han sido publicados anualmente. En 2011 el SciFinder generó 12 000 datos con la palabra “curcumin”. Entre ellos se encontraban cerca de 1000 artículos de revisión, cerca de 1.500 patentes y 56 referencias a ensayos clínicos [35].

La lista de los blancos moleculares de la curcumina es excepcionalmente larga (**figura 4**) e incluye blancos en diversas vías de transducción de señales intracelulares dentro de las que destacan una gran variedad de proteínas quinasas: la quinasa activadora dependiente de ciclina (cAK), las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las quinasas focales de adhesión (FAK), Las Janus quinasas (JAK), la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa B (PKB), La proteína quinasas C (PKC), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la tirosina quinasa (TK), entre otras.

Tiene además como blancos farmacológicos una gran variedad de factores de transcripción, citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión celular y proteínas relacionadas con la cascada de la apoptosis, todos ellos citados en una gran variedad de artículos de revisión; así mismo tiene una gran variedad de enzimas que se han reconocido como blancos directos, entre ellas la ciclo oxigenasa 2 (COX2), la fosfolipasa A2 (PLA₂) y la 5- lipooxigenasa (5-LOX) [36], [37], [38], [39], [40], [41].

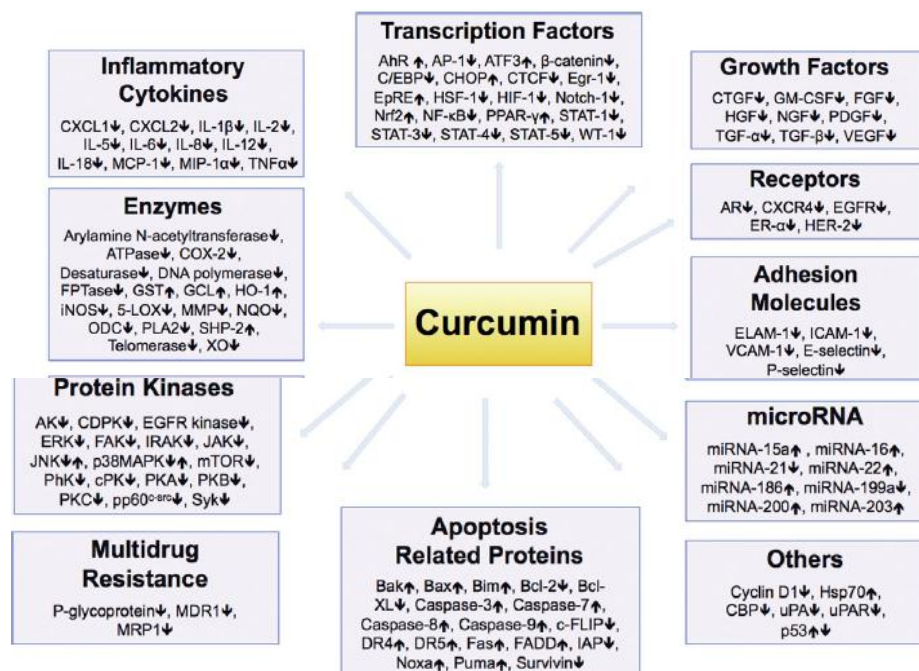


Figura 4. Blancos farmacológicos de la curcumina, tomado de referencia [42] se observan los blancos farmacológicos reportados para la curcumina: factores de transcripción, factores de crecimiento, receptores, moléculas de adhesión, microRNAs, proteínas relacionadas con la apoptosis, proteínas quinasas y citoquinas inflamatorias entre otros, así como sus efectos sobre estos blancos mencionados.

Dentro de los blancos farmacológicos directos más documentados de la curcumina, están las mencionadas enzimas COX-2, 5-LOX y óxido nítrico sintasa (NOS), sobre las cuales curcumina ejerce un efecto inhibitorio directo, con lo que se disminuye la producción de mediadores que amplifican el proceso inflamatorio [7]. Así mismo, dentro de los blancos de tipo factor de transcripción, está muy documentada la inhibición que ejerce curcumina sobre la activación del factor de transcripción NFκB, envuelto en la regulación de la respuesta celular inmune e inflamatoria y en la respuesta proliferación celular [7] [43]. Se ha reportado que este factor tiene un rol importante en la patogénesis de la lesión de músculo esquelético por isquemia reperusión [43].

Teniendo en cuenta los antecedentes citados en cuanto al efecto antiinflamatoria de la curcumina, pudo demostrarse en un modelo experimental de lesión de músculo esquelético por I/R en una población de ratas Wistar adultas, que la administración intraperitoneal de curcumina disminuía significativamente niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias (TNF- α / IL-1 β), así como aumento en la actividad de enzimas antioxidantes CAT y SOD [44].

4.4.2 Aspectos farmacocinéticos de la curcumina

La curcumina se admite como un compuesto seguro y bien tolerado, incluso a muy altas dosis; según el reporte de la FAO/WHO, la recomendación actual de la dosis máxima diaria de curcumina es de 0-1mg/kg sin reporte de efectos adversos [45].

Pese a esta seguridad en el uso de curcumina, sus propiedades farmacocinéticas han mostrado ser una fuerte limitante para su uso como agente terapéutico, principalmente por su baja biodisponibilidad [45]. Frente a este aspecto, se debe considerar que la razón para que un agente farmacológico cualquiera tenga baja biodisponibilidad, tiene que ver con alguna de estas variables: tiene pobre absorción, tiene una tasa alta de metabolismo, se inactiva metabólicamente muy rápido o tiene una rápida eliminación [45]. En el caso de curcumina, los estudios realizados en las pasadas 3 décadas, reportan pobre absorción y rápido metabolismo, lo que afecta en gran medida su biodisponibilidad.

Una de las más importantes observaciones al respecto, tiene que ver con los extremadamente bajos niveles plasmáticos encontrados para curcumina. Tras administrar oralmente curcumina a 1g/kg a ratas Sprague- Dawley, Wahlstrom y colaboradores identificaron cantidades mínimas en sangre, evidenciando que su absorción intestinal es mínima. Así mismo, Ravindranath y colaboradores en 1980,

administraron oralmente 400 mg de curcumina a ratas y no encontraron curcumina en sangre [46].

Por su parte, Pan y colaboradores investigaron las propiedades farmacocinéticas de curcumina tras su administración oral e intra peritoneal en ratones. Con administración oral observaron, a 1 g/kg, niveles plasmáticos bajos -0,13 microgramos/mL- después de 15 minutos y un máximo de 0,22 microgramos/ mL después de 1 hora, haciéndose indetectables después de 6 horas. Así mismo, administraron 0,1 g/kg intraperitonealmente, encontrando niveles plasmáticos pico de 2,25 microgramos/ mL después de 15 minutos, haciéndose indetectables después de 1 hora [46].

En la **tabla 1** se comparan los resultados obtenidos tras la medición de picos plasmáticos en roedores y en humanos y puede apreciarse que la vía de administración es clave y que los resultados de niveles séricos no son directamente comparables (en humanos y roedores), siendo en todo caso la vía oral la que menor biodisponibilidad presenta.

species	route ^a	dose	plasma/tissue	levels
mice	i.p.	100 mg/kg	plasma	2.25 µg/mL
			intestine	117 ± 6.9 µg/g
			spleen	26.1 ± 1.1 µg/g
			liver	26.9 ± 2.6 µg/g
			kidney	7.5 ± 0.08 µg/g
			brain	0.4 ± 0.01 µg/g
mice	oral	100 mg/kg	plasma	0.22 µg/mL
mice	i.p.	100 mg/kg	plasma	25 ± 2 nmol/mL
			intestinal mucosa	200 ± 23 nmol/g
			liver	73 ± 20 nmol/g
			brain	2.9 ± 0.4 nmol/g
			heart	9.1 ± 1.1 nmol/g
			lungs	16 ± 3 nmol/g
			muscle	8.4 ± 6 nmol/g
			kidney	78 ± 3 nmol/g
rat	oral	2 g/kg	stomach	53.3 ± 5.1 (µg/g)
			small intestine	58.6 ± 11.0 (µg/g)
			cecum	51.5 ± 13.5 (µg/g)
			large intestine	5.1 ± 2.5 (µg/g)
rat	oral	340 mg/kg	serum	6.5 ± 4.5 nM

rat	oral	1g/kg	serum	0.5 µg/mL
rat	oral	2 g/kg	serum	1.35 ± 0.23 µg/mL
rat	oral	500 mg/kg	plasma	0.06 ± 0.01 µg/mL
rat	i.v.	10 mg/kg	plasma	0.36 ± 0.05 µg/mL
human	oral	2 g/kg	serum	0.006 ± 0.005 µg /mL
human	oral	4–8 g	serum	0.4–3.6 µM
human	oral	10 g	serum	50.5 ng/m
human	oral	12 g	serum	51.2 ng/mL
human	oral	3.6 g	plasma	11.1 ± 0.6 nmol/mL
human	oral	0.4–3.6 g	colorectum	7–20 nmol/g

^a Key: i.p., intraperitoneal; i.v., intravenous.

Tabla 1. Niveles séricos y en tejidos de curcumina en roedores y humanos tras rutas de administración oral, intravenosa e intraperitoneal, tomado de referencia [46].

En cuanto a la distribución de curcumina en tejidos, existe un número limitado de publicaciones al respecto. Ravindranath y colaboradores demostraron que tras administración oral de curcumina 400 mg ratas, se encontraron sólo trazas en riñón e hígado de curcumina sin cambios. A los 30 minutos, el 90% de la curcumina fue encontrada en estómago e intestino delgado y a las 24 horas sólo el 1% estaba presente en estos compartimentos.

En ratones, Perkins y colaboradores demostraron en 2002, que existían diferencias significativas en la distribución de curcumina tras su administración por vía oral y por vía intraperitoneal, sugiriéndose que la farmacocinética observada en los tejidos tras la administración de curcumina por vía intraperitoneal no puede compararse directamente con la observada tras dosificar por vía oral [46].

En cuanto al metabolismo, el hígado se reconoce como el órgano con mayor responsabilidad en el metabolismo de curcumina, encontrándose que el glucuronido de curcumina, tetrahidrocurcumina (THC), curcumina sulfato, hexahidrocurcumina y hexahidrocurcuminol, son los principales metabolitos encontrados para curcumina in vivo (**figura 5**) [46].

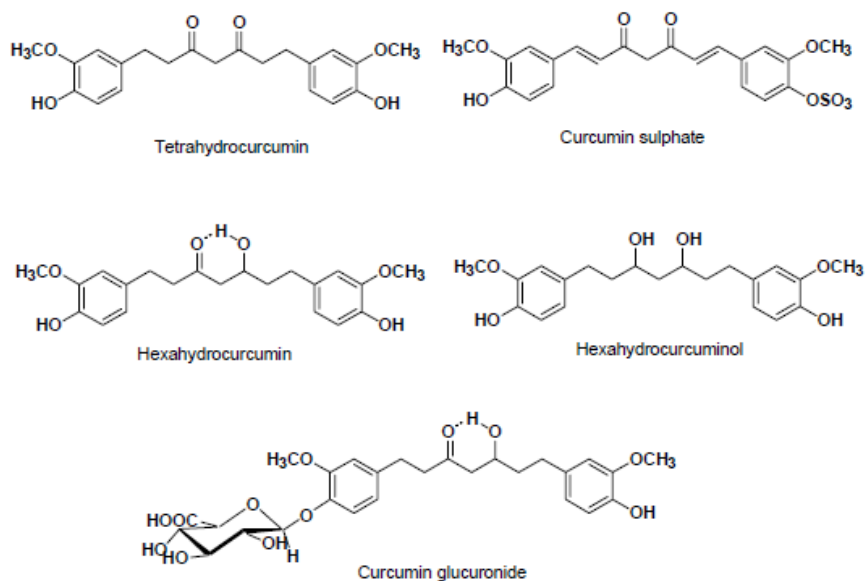


Figura 5. Principales metabolitos de curcumina reconocidos in vivo, tomado de referencia [47].

También se han reportado en cantidades mucho menores otros dos metabolitos: dihidrocurcumina y octahidrocurcumina [48].

Acerca de si los metabolitos de curcumina son tan activos como ella, no se tiene claridad. Mientras que la mayoría de estudios indican que los glucuronidos de curcumina y la tetrahydrocurcumina son menos activos que curcumina, existen otros estudios que sugieren que incluso pueden ser más activos. Por ejemplo, la tetrahydrocurcumina se encontró más efectiva como antidiabética y antioxidante en ratas con diabetes tipo 2, mientras que en otro estudio se encontró que tetrahydrocurcumina tenía un efecto anti inflamatorio y antiproliferativo muy inferior a curcumina. La diferencia encontrada en varios de estos estudios puede atribuirse a la naturaleza de los ensayos empleados en ellos [46].

En cuanto a la vida media, Wahlstrom y Blennow reportaron que cuando se administraba 1g/ kg de curcumina oralmente a ratas, 75% de ésta se excretaba en heces y cantidades mínimas se encontraban en orina, mientras que tras la administración intravenosa e intraperitoneal se encontraba excreción biliar en ratas canuladas; pese a esto, la evidencia existente en la literatura actual, no es suficiente para hacer conclusiones sobre los factores que controlan la eliminación in vivo de curcumina y es necesaria más investigación en este campo [46].

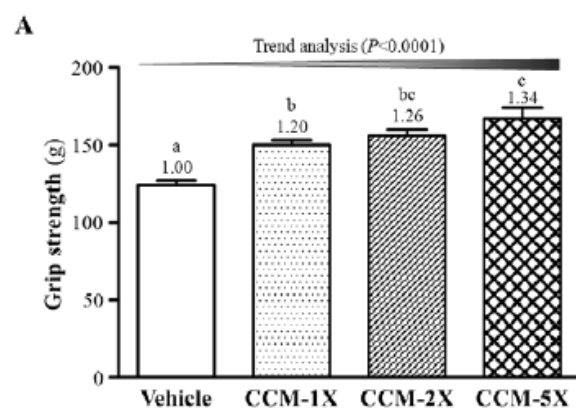
Dada esta información, se concluye que la biodisponibilidad de curcumina está fuertemente disminuida al ser administrada por vía oral y por tanto, para observar niveles plasmáticos que permitan evaluar su efectividad, se hace necesaria su administración parenteral.

4.4.3 Curcumina en la función muscular

En estudios de función muscular, los efectos de la curcumina son muy pocos, encontrándose que tiene efectos inhibitorios sobre la actividad ATPasa de las bombas SERCA en el músculo esquelético [49], [50]; estos estudios sugieren que esta inhibición podría tener efectos adversos sobre la contracción muscular. A pesar de estos hallazgos, en un estudio en los parámetros funcionales en sacudida simple en el músculo extensor digitorum longus (EDL), según un poster expuesto por Pinniger y colaboradores, no se encontraron diferencias significativas sobre la fuerza máxima, el tiempo hacia el pico, ni en el tiempo medio de relajación en sacudida simple [51], sin tener información de sus efectos en tiempo de latencia, tasa máxima de contracción, en la tasa máxima de relajación, en la tensión tetánica ni en el índice de fatiga en contracciones subtetánicas repetidas.

En 2015, Huang y colaboradores midieron el efecto de curcumina en un modelo de ratones que desarrollaron fatiga tras nadar excesivamente, reportando que la suplementación con curcumina a dosis de 12.3 mL/kg, aleatorizándose los animales en 4 grupos (10 en cada uno) para tratamiento oral por sonda con curcumina una vez al día x 28 días consecutivos. El vehículo fue agua y los grupos experimentales recibieron curcumina 12,3 mL (CCM 1x), 24,6mL (CCM 2x) y 61,5mL/kg (CCM 5x) respectivamente. El grupo vehículo recibió el mismo volumen de solución equivalente a su peso corporal pero sin principio activo.

En estos biomodelos, tuvo efecto positivo dosis dependiente como ergogénico y evidenciando mayor fuerza de agarre de la extremidad, como se muestra en la **gráfica 1**:



Gráfica 1. Se observa que en el experimento descrito llevado a cabo por Huang y colaboradores, el aumento de la fuerza de agarre en la extremidad fue dosis dependiente, con mejores resultados en el grupo que recibió 5 veces la dosis de curcumina (61,5 mL/Kg, Grupo CCM-5X). **CCM:** curcumina [52].

Respecto al uso de curcumina en lesión por isquemia reperusión en músculo esquelético, únicamente se encontró un reporte experimental de 2012 en ratas wistar, en donde Avci y colaboradores compararon los efectos de administrar curcumina Vs. Alfa tocoferol, en cuanto a la expresión de marcadores de estrés oxidativo y proteínas anti oxidantes en tejido, así como nivel sérico de citoquinas proinflamatorias [10]. Los autores reportaron que hubo mayor actividad de proteínas anti oxidantes SOD y

catalasas en tejido en el grupo tratado con curcumina Vs el grupo tratado con alfa tocoferol, así como disminución de marcadores de estrés oxidativo tisular y de niveles séricos de citoquinas proinflamatorias en el grupo tratado con curcumina, como se observa en las **tablas 2 y 3** a continuación:

Comparison of Effects of Ischemia/Reperfusion (I/R) on the Muscle GSH, SOD, CAT, MDA, PO Levels with the Curcumin- + IR, vit e+ I/R, Control and Sham Groups

	Sham	I/R-SF control	I/R-curcumin	I/R- α -tocopherol
GSH (μ mol/g)	2.11 $\pm$ 0.18	0.94 $\pm$ 0.11***	2.03 $\pm$ 0.12 ^{††}	1.83 $\pm$ 0.13 ^{††}
SOD (U/mgprotein)	0.95 $\pm$ 0.11	0.48 $\pm$ 0.06**	0.89 $\pm$ 0.10 [†]	0.88 $\pm$ 0.05 [†]
Catalase (U/mg protein)	61.01 $\pm$ 6.35	26.57 $\pm$ 5.26**	57.70 $\pm$ 5.38 ^{††}	52.25 $\pm$ 6.44 [†]
MDA (nmol/g)	18.30 $\pm$ 2.59	44.67 $\pm$ 5.81**	19.39 $\pm$ 3.09 ^{††}	23.84 $\pm$ 4.83 [†]
PO (nmol carbonyl/mg)	1.53 $\pm$ 0.17	4.34 $\pm$ 0.51***	1.59 $\pm$ 0.16 ^{††}	2.21 $\pm$ 0.27 ^{†††}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the sham group.

[†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$, ^{†††} $P < 0.001$ compared with the I/R group.

Tabla 2. Efecto comparativo de la curcumina en lesión por isquemia reperusión (I/R) frente a grupos experimentales Sham (únicamente expuesto a cirugía de exposición muscular, sin lesión por I/R), I/R-SF (únicamente con lesión por isquemia reperusión) y grupo tratado con alfa tocoferol tras la isquemia. Trabajo experimental realizado por Avci y colaboradores en ratas wistar con administración de curcumina intraperitoneal a 100 mg/kg. **GSH:** glutatión, **SOD:** Superóxido dismutasa, **MDA:** Malondialdehído, **PO:** proteínas oxidadas [10].

Comparison of Effects of Ischemia/Reperfusion (I/R) on the Muscle TNF- α and IL-1 β levels with the Curcumin- + IR, vit e+ I/R, Control and Sham Groups

	Control	I/R	I/R-curcumin	I/R- α -tocopherol
TNF- α (pg/mL)	7.63 $\pm$ 1.14	33.98 $\pm$ 3.65***	11.15 $\pm$ 2.29 ^{†††}	16.17 $\pm$ 2.97 ^{††}
IL-1 β (pg/mL)	10.13 $\pm$ 1.46	32.69 $\pm$ 2.94***	12.89 $\pm$ 1.98 ^{†††}	19.17 $\pm$ 2.90 ^{††}

*** $P < 0.001$ compared with the sham group.

^{††} $P < 0.01$, ^{†††} $P < 0.001$ compared with the I/R group.

Tabla 3. Efecto comparativo de la curcumina frente a los grupos experimentales ya mencionados en la lesión por I/R de ratas wistar sobre niveles séricos de citoquinas proinflamatorias **TNF alfa:** Factor de necrosis tumoral alfa e **IL-1beta:** Interleuquina 1 beta [10].

Teniendo en cuenta lo anterior, pese a la evidencia actual del uso de curcumina por sus efectos anti oxidantes y efectos antinflamatorios a nivel de la lesión de isquemia reperusión, no se cuenta con información de sus efectos en los parámetros funcionales (sacudida simple, tétanos e índice de fatiga en contracciones repetidas) en músculos con predominios de fibras oxidativas y glucolíticas, por ese motivo con este trabajo de investigación queremos responder la siguiente pregunta:

¿La curcumina administrada intraperitonealmente acelera la recuperación funcional en músculos esqueléticos post isquemia reperusión en un modelo de ratas wistar?

5. Materiales y métodos

Animales para experimentación:

Se adelantó un estudio de investigación basado en experimentación con animales. Se emplearon 50 ratas adultas machos Wistar con pesos entre 250 a 300g. Los biomodelos se alojaron en grupos de cuatro ratas en cada jaula plástica en el bioterio de la Universidad ICESI. 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 de dicha **(Anexo 1)** Todos los protocolos experimentales propuestos estuvieron bajo revisión del Comité de Ética Animal de la Universidad ICESI. Los procedimientos que se emplearon durante el estudio en principio 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 realizaron 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 estos animales no fueron usados para experimentación.

Procedimientos generales:

Para todos los procedimientos los animales fueron pesados y luego llevados a sedación profunda. Primero, se realizó 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) (6mg/100g de peso corporal), seguida de inyecciones de mantenimiento cada hora con pentobarbital sódico (2 mg/100g de peso corporal) [29], [6]. El pentobarbital sódico induce sedación profunda, lo cual es importante para estos experimentos, ya que se evita así interferir de manera importante con el sistema nervioso periférico durante los mismos. Una vez terminado cada experimento, los animales fueron sacrificados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Pental® - INVET) (18mg/100g de peso corporal). Luego de aplicar esta dosis letal, el animal se mantuvo bajo observación en el mismo montaje experimental durante 15 minutos, tiempo durante el cual se verificará el cese de la respiración, la ausencia de latidos cardiacos y la presencia de opacidad corneal. En presencia de estos signos de muerte, el animal se dispuso 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.

Músculos para experimentación:

Como músculo esquelético de fibras tipo I, se utilizó el músculo soleo, el cual se considera que contiene más de un 80% de fibras oxidativas y 20% de fibras glucolíticas [53]. 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 inervación proviene del nervio tibial y por ramas de los nervios espinales S1 y S2 [53]. Como músculo esquelético de fibras tipo II, se utilizó el músculo extensor radial largo del carpo (ERLC), el cual contiene más de un 80% de fibras glicolíticas y 20% de fibras

oxidativas [54]. 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 e innervado por el nervio radial, los nervios espinales C5 y C6, y las ramas profundas del nervio radial [54]

Escogencia de la muestra

El tamaño de la muestra total (n=50), se calculó con base en el número de grupos experimentales que se trabajaron en el marco del proyecto y a los parámetros analizados. Para grupo experimental, si bien no conocíamos la desviación típica de las medias que arrojaran los parámetros a medir y analizar, presumimos que la distribución puede ser normal, considerando que en los estudios previos se utilizó la t de Student para verificar la significancia estadística entre las diferencias observadas en las poblaciones de datos obtenidos [1][14] [55] en los cuales utilizaron entre 3 y 6 animales por grupo de experimentación. Considerando que el n=3 es pequeño en algunos de estos estudios previos, dejamos el n=5 por grupo, con el ánimo de disminuir la varianza de los datos y superar ligeramente el n recomendado.

Lesión de isquemia – reperusión:

El procedimiento para la generación de lesión por isquemia-reperusión de los músculos Soleo y ERLC han sido previamente descrito [29], [6]. Las ratas una vez anestesiadas fueron colocadas en posición en decúbito prono, cada extremidad del lado derecho (miembro superior e inferior) se puso dentro de 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 [56]. 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 centrípetamente, cuando se insufla aire al torniquete. Para lograr una isquemia absoluta, se insufló aire desde una perilla de tensiómetro hasta llegar a presiones de 350 ± 10 mmHg [56]. Esta presión se controló a través de un manómetro de presión durante el tiempo que duró la isquemia, para provocar la reperusión la presión dentro de los torniquetes se disminuyó a 0mmHg.

Medición de parámetros funcionales:

El procedimiento de preparación de los músculos soleo y extensor radial largo del carpo para las mediciones funcionales en vivo fueron previamente descritas [6]. En resumen, el tendón distal de ambos grupos musculares fue aislado, cortado y atado con hilo quirúrgico. Las ratas fueron colocadas en posición prona y se aseguró el músculo al transductor de fuerza (Adinstruments, model 1030), la temperatura muscular se mantuvo alrededor de $34 \pm 0,5^\circ\text{C}$ a través de dos cámaras de refrigeración conectada a un baño de circulación de agua constante (Biopac System) y controlada con un termómetro digital.

Se realizó una perfusión externa de 15 ± 2 ml/minuto, con una solución ringer con concentraciones en valores de mM de 135 NaCl; 5 KCl; 2 MgCl_2 ; 2 CaCl_2 ; 5 D-glucosa y 10 Hepes, para mantener ambos grupos musculares humedecidos durante todo el tiempo de experimentación.

Antes de iniciar las mediciones de sacudida simple se determinó la longitud óptima de ambos grupos musculares aplicando estimulaciones tetánicas de pulsos de 0,2 ms, frecuencia de 100 Hz a 15 voltios para ambos grupos musculares por estudios previos en nuestro laboratorio y tomando datos de Carvalho 1992 y McKee 1996, usando un

estimulador (Powerlab 16/35) conectado a electrodos de platino colocados directamente sobre el vientre muscular.

Aplicación de curcumina:

La aplicación de la curcumina (Curcumin from Curcuma longa, Marca Sigma, St. Louis, MO) se realizó por vía intraperitoneal (100mg/Kg) previamente descrito en trabajos de efectos protectivos anti-oxidativos y anti-inflamatorio en lesión de isquemia reperusión de músculo esquelético y cardiaco [10], [57], [58] 10 minutos antes de iniciar la reperusión, utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) 1 mL como vehículo de dilución

Caracterización de los parámetros funcionales:

Se evaluaron medidas de sacudida simple, tensión tetánica y cambios funcionales a estimulación repetida a través del índice de fatiga a baja frecuencia de estimulación (fatiga 10 minutos) y del índice de fatiga a alta frecuencia de estimulación (fatiga 5 minutos).

Parámetros funcionales en sacudida simple.

Para las sacudidas simples en condiciones isométricas que se registraron en cada uno de los músculos se dio 1 pulso de 0,2ms, de 20 voltios cada 30 segundos durante diez minutos y se analizaron los siguientes componentes de la sacudida: (1) el tiempo de latencia, (2) la fuerza máxima de la contracción, (3) la tasa máxima de contracción, (4) la tasa máxima de relajación.

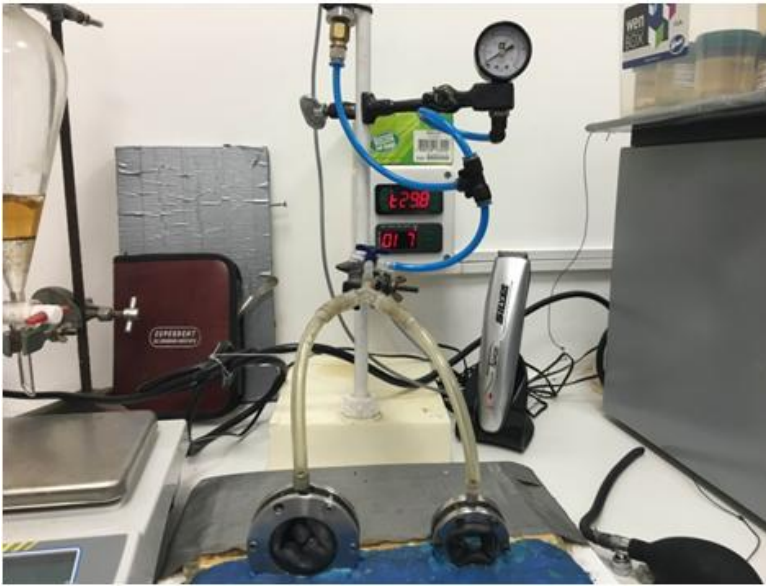


Foto 1. Montaje experimental para la realización de la isquemia

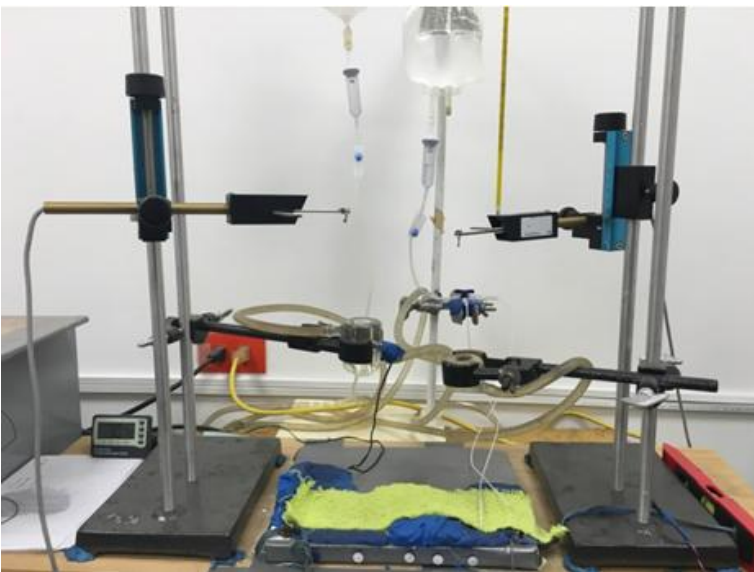


Foto 2. Montaje experimental para la medición de función muscular

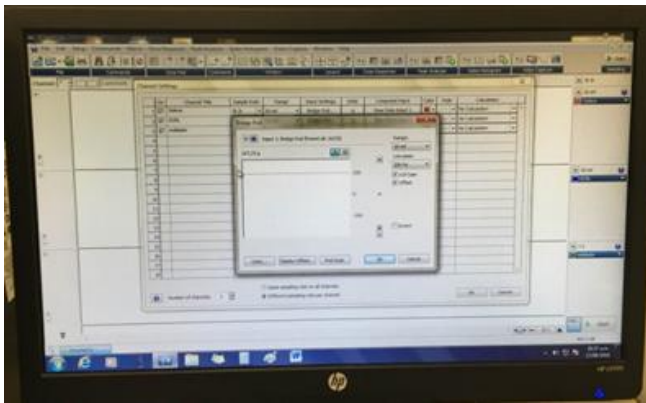
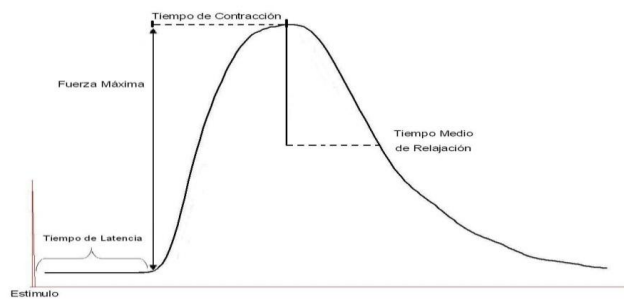
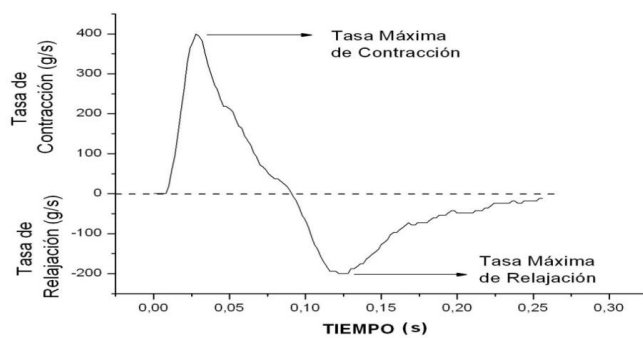


Foto 3. Análisis de datos en Power Lab 16/35



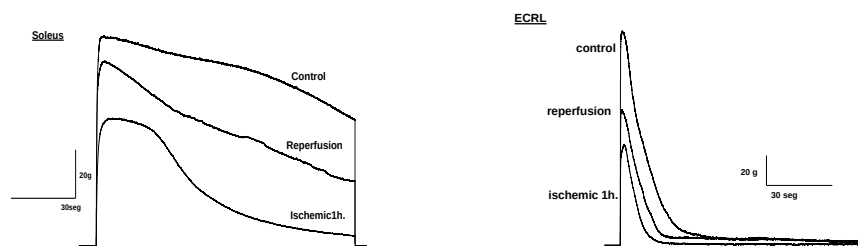
Gráfica 2. Contracción típica en sacudida simple del músculo soleo. Se detallan las mediciones del tiempo de latencia, la fuerza máxima de la sacudida, el tiempo de contracción y el tiempo medio de relajación. Datos tomados en nuestro laboratorio.



Gráfica 3. Derivada en función del tiempo de la contracción típica en sacudida simple del músculo soleo.

Parámetros funcionales en la contracción tetánica.

Para la generación de tensiones tetánicas se aplicó una estimulación de 1 minuto de pulsos de estimulación de 0,2ms, una frecuencia de 50 Hz a 15 voltios para el músculo soleo y para el músculo ERLC se aplicó una estimulación de 1 minuto de pulsos de estimulación de 0,2ms, una frecuencia de 100 Hz a 20 voltios por estudios previos en nuestro laboratorio y tomando datos de Carvalho 1992 y McKee 1996 y se analizaron los siguientes componentes del Tétanos: (1) *Fuerza tetánica máxima*: Es la diferencia entre la tensión de contracción pico y la tensión pasiva. (2) *Tiempo de fatiga*: Se determinó el tiempo que se demoró la fuerza en llegar al 70% de la fuerza inicial ($F_{70\%}$) para el músculo soleo y el tiempo que se demoró la fuerza en llegar al 50% de la fuerza inicial ($F_{50\%}$) para el músculo ECRL.



Gráfica 4. Contracción tetánica típica músculo soleo y ECRL. Datos tomados en nuestro laboratorio.

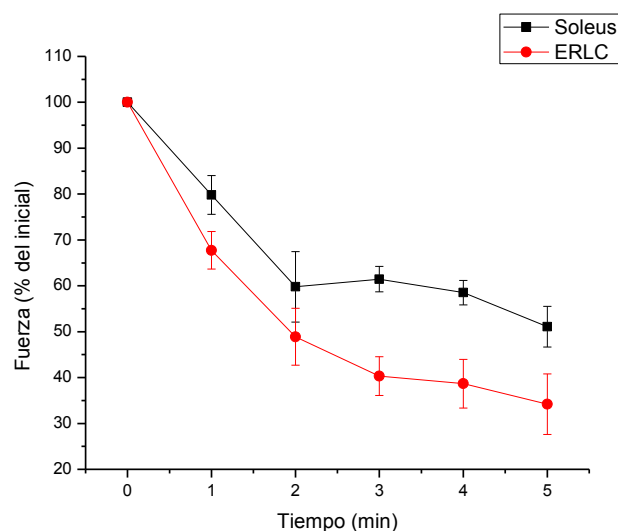
Índice de fatiga a baja frecuencia de estimulación (fatiga 10 minutos):

Para determinar la función muscular a estimulación repetida a baja frecuencia de estimulación se aplicaron trenes de 344 ms de pulsos de 0,2ms, frecuencia de 100hz y 20 voltios cada 2,84 seg durante 10 minutos para un total de 211 contracciones para

ambos grupos musculares [59]. En este protocolo se analizó la caída de la fuerza durante el tiempo de estimulación.

Índice de fatiga a alta frecuencia de estimulación (fatiga 5 minutos):

Para determinar la función muscular a estimulación repetida a baja frecuencia de estimulación se aplicaron trenes de 344 ms de pulsos de 0,2ms, frecuencia de 100hz y 20 voltios cada 1,39 seg. Durante 5 minutos para un total de 215 contracciones para ambos grupos musculares [59]. En este protocolo se analizó la caída de la fuerza durante el tiempo de estimulación.



Gráfica 5. Índice de fatiga (5) en músculo soleo y ECRL. Datos tomados en nuestro laboratorio.

Grupos experimentales

El experimento se diseñó con 10 grupos organizados así de acuerdo al **esquema 1**, así:

- (1) Grupo **control**, (n=5): En este grupo se anestesió a los animales y se colocaron los músculos en los transductores donde se midió por una hora la sacudida simple, la tensión tetánica y los índices de fatiga. Luego de este tiempo se realizó eutanasia al animal y se obtuvieron muestras para futuras pruebas histológicas.
- (2) Grupo isquemia reperusión 1 día **I/R 1d**, (n=5): En este grupo se anestesió a los animales y luego se colocaron sus extremidades superior e inferior en los torniquetes donde se indujo isquemia al insuflar los torniquetes neumáticos hasta obtener una presión de 350 ± 10 mmHg. La isquemia se mantuvo durante 120 minutos. Luego se liberó la presión de los torniquetes para inducir la reperusión; después de un día se realizó la disección de los músculos y se colocaron los músculos en los transductores donde se midió por una hora la sacudida simple, la tensión tetánica y los índices de fatiga. Luego de este tiempo se realizó eutanasia a los animales se obtuvieron muestras para futuras pruebas histológicas.
- (3) Grupo isquemia reperusión 3 días **I/R 3d**, (n=5): En este grupo se anestesió a los animales y luego se colocaron sus extremidades superior e inferior en los torniquetes donde se indujo isquemia al insuflar los torniquetes neumáticos hasta obtener una presión de 350 ± 10 mmHg. La isquemia se mantuvo durante 120 minutos. Luego se liberó la presión de los torniquetes para inducir la reperusión; después de tres días se realizó la disección de los músculos y se colocaron los músculos en los transductores donde se midió por una hora la sacudida simple, la tensión tetánica y los índices de fatiga. Luego de este tiempo se realizó eutanasia a los animales se obtuvieron muestras para futuras pruebas histológicas.
- (4) Grupo isquemia reperusión 7 días **I/R 7d**, (n=5): En este grupo se anestesió a los animales y luego se colocaron sus extremidades superior e inferior en los torniquetes donde se indujo isquemia al insuflar los torniquetes neumáticos hasta

obtener una presión de 350 ± 10 mmHg. La isquemia se mantuvo durante 120 minutos. Luego se liberó la presión de los torniquetes para inducir la reperfusión; después de siete días se realizó la disección de los músculos y se colocaron los músculos en los transductores donde se midió por una hora la sacudida simple, la tensión tetánica y los índices de fatiga. Luego de este tiempo se realizó eutanasia a los animales se obtuvieron muestras para futuras pruebas histológicas.

- (5) Grupo isquemia reperfusión + dimetilsulfóxido (DMSO) 1 día **I/R DMSO 1d**, (n=5): En este grupo se anestesió a los animales y luego se colocaron sus extremidades superior e inferior en los torniquetes donde se indujo isquemia al insuflar los torniquetes neumáticos hasta obtener una presión de 350 ± 10 mmHg. La isquemia se mantuvo durante 120 minutos y 10 minutos antes de que se liberara la presión de los torniquetes para inducir la reperfusión, se aplicó 1 ml de DMSO intraperitoneal; después de un día se realizó la disección de los músculos y se colocaron los músculos en los transductores donde se midió por una hora la sacudida simple, la tensión tetánica y los índices de fatiga. Luego de este tiempo se realizó eutanasia a los animales se obtuvieron muestras para futuras pruebas histológicas.
- (6) Grupo isquemia reperfusión + dimetilsulfóxido (DMSO) 3 días **I/R DMSO 3d**, (n=5): En este grupo se anestesió a los animales y luego se colocaron sus extremidades superior e inferior en los torniquetes donde se indujo isquemia al insuflar los torniquetes neumáticos hasta obtener una presión de 350 ± 10 mmHg. La isquemia se mantuvo durante 120 minutos y 10 minutos antes de que se liberara la presión de los torniquetes para inducir la reperfusión, se aplicó 1 ml de DMSO intraperitoneal; después de tres días se realizó la disección de los músculos y se colocaron los músculos en los transductores donde se midió por una hora la

sacudida simple, la tensión tetánica y los índices de fatiga. Luego de este tiempo se realizó eutanasia a los animales se obtuvieron muestras para futuras pruebas histológicas.

- (7) Grupo isquemia reperusión + dimetilsulfóxido (DMSO) 7 días **I/R DMSO 7d**, (n=5): En este grupo se anestesió a los animales y luego se colocaron sus extremidades superior e inferior en los torniquetes donde se indujo isquemia al insuflar los torniquetes neumáticos hasta obtener una presión de 350 ± 10 mmHg. La isquemia se mantuvo durante 120 minutos y 10 minutos antes de que se liberara la presión de los torniquetes para inducir la reperusión, se aplicó 1 ml de DMSO intraperitoneal; después de siete días se realizó la disección de los músculos y se colocaron los músculos en los transductores donde se midió por una hora la sacudida simple, la tensión tetánica y los índices de fatiga. Luego de este tiempo se realizó eutanasia a los animales se obtuvieron muestras para futuras pruebas histológicas.

- (8) Grupo isquemia reperusión + dimetilsulfóxido (DMSO) + curcumina 1 día **I/R DMSO CURC 1d**, (n=5): En este grupo se anestesió a los animales y luego se colocaron sus extremidades superior e inferior en los torniquetes donde se indujo isquemia al insuflar los torniquetes neumáticos hasta obtener una presión de 350 ± 10 mmHg. La isquemia se mantuvo durante 120 minutos y 10 minutos antes de que se liberara la presión de los torniquetes para inducir la reperusión, se aplicó CURCUMINA 100mg/kg en 1 ml de DMSO intraperitoneal; después de un día se realizó la disección de los músculos y se colocaron los músculos en los transductores donde se midió por una hora la sacudida simple, la tensión tetánica y los índices de fatiga. Luego de este tiempo se realizó eutanasia a los animales se obtuvieron muestras para futuras pruebas histológicas.

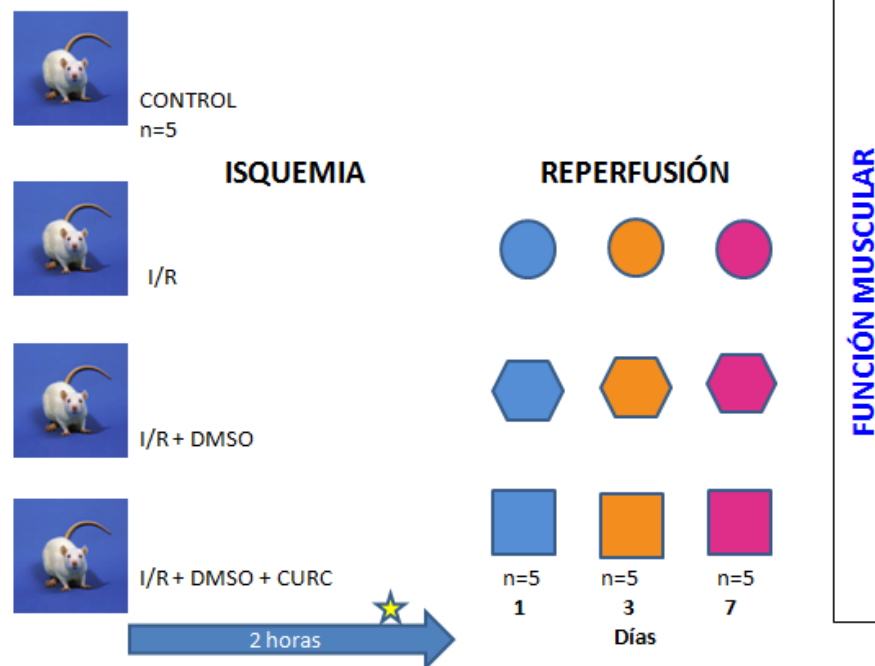
(9) Grupo isquemia reperusión + dimetilsulfóxido (MDSO) + curcumina 3 días **I/R**

DMSO CURC 3d, (n=5): En este grupo se anestesió a los animales y luego se colocaron sus extremidades superior e inferior en los torniquetes donde se indujo isquemia al insuflar los torniquetes neumáticos hasta obtener una presión de 350 ± 10 mmHg. La isquemia se mantuvo durante 120 minutos y 10 minutos antes de que se liberara la presión de los torniquetes para inducir la reperusión, se aplicó CURCUMINA 100mg/kg en 1 ml de DMSO intraperitoneal; después de tres días se realizó la disección de los músculos y se colocaron los músculos en los transductores donde se midió por una hora la sacudida simple, la tensión tetánica y los índices de fatiga. Luego de este tiempo se realizó eutanasia a los animales se obtuvieron muestras para futuras pruebas histológicas.

(10) Grupo isquemia reperusión + dimetilsulfóxido (MDSO) + curcumina 7 días **I/R**

DMSO CURC 7d, (n=5): En este grupo se anestesió a los animales y luego se colocaron sus extremidades superior e inferior en los torniquetes donde se indujo isquemia al insuflar los torniquetes neumáticos hasta obtener una presión de 350 ± 10 mmHg. La isquemia se mantuvo durante 120 minutos y 10 minutos antes de que se liberara la presión de los torniquetes para inducir la reperusión, se aplicó CURCUMINA 100mg/kg en 1 ml de DMSO intraperitoneal; después de siete días se realizó la disección de los músculos y se colocaron los músculos en los transductores donde se midió por una hora la sacudida simple, la tensión tetánica y los índices de fatiga. Luego de este tiempo se realizó eutanasia a los animales se obtuvieron muestras para futuras pruebas histológicas.

Diseño del Estudio



Esquema 1. Diseño del estudio experimental. Previo aval de comité de ética animal de universidad ICESI y procedimiento de anestesia, en ratas wistar adulto machos, se separó un grupo control (que no recibió isquemia reperfusión) y 3 grandes grupos experimentales: un grupo que recibió únicamente isquemia reperfusión (I/R), un grupo que recibió isquemia reperfusión + el vehículo en el que se diluyó curcumina, esto es, dimetil sulfóxido (I/R+DMSO) y un grupo que recibió isquemia reperfusión + DMSO y curcumina 100mg/kg intraperitoneales (I/R+DMSO+CURC) que recibieron isquemia de dos horas en extremidades anterior (músculo ERLC-glucolítico) y posterior (músculo soleo-oxidativo). A su vez, cada uno de estos grupos experimentales se dividió en tres subgrupos de acuerdo a su tiempo de reperfusión (recuperación), de 1 día, 3 días y 7 días. Posterior al tiempo de recuperación se midió la función muscular como ya fue descrito y se procedió al sacrificio de los biomodelos

Análisis estadístico

Para cada grupo experimental (por condición de grupo y musculo) se verificó la normalidad de las variables numéricas por medio de la prueba de Shapiro-Wilk. En términos generales, se validó este supuesto (Anexo 2) por lo que estas variables fueron resumidas con el promedio y la desviación estándar de la media (DE).

Para determinar diferencias entre los 10 grupos experimentales, en las variables numéricas con seguimiento en el tiempo (fatiga 5 minutos y fatiga 10 minutos), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas. El supuesto de esfericidad (similar a la igualdad de varianzas en la ANOVA unifactorial) fue evaluado por medio de la Prueba de esfericidad de Mauchly. Las pruebas de comparaciones múltiples post-anova incluyeron la prueba de Bonferroni y Duncan.

Para las variables numéricas sin seguimiento en el tiempo (fuerza máxima en sacudida simple, tiempo de latencia, tasa máxima de contracción en sacudida simple, tasa máxima de relajación en sacudida simple , fuerza máxima en contracción tetánica, tasa máxima de contracción tetánica, fatiga en tétanos) las comparaciones entre los grupos experimentales se hicieron por medio de una ANOVA de una vía. Se validó la homogeneidad de varianzas por medio de la prueba de Levene. Al igual que en la ANOVA de medidas repetidas, las pruebas de comparaciones múltiples utilizadas fueron la prueba de Bonferroni y Duncan. Los resultados son presentados como Promedio $\pm$ Error estándar de la media y se consideró un valor $p < 0,05$ como límite de significancia.

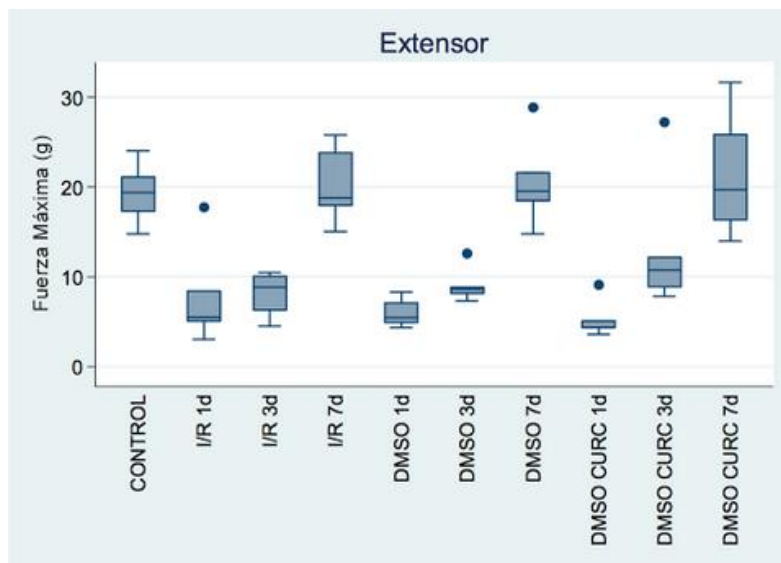
Para las variables sin seguimiento en el tiempo se realizaron gráficas de Box Plot, señalándose los datos atípicos (que no pertenecen a la distribución) como puntos en los grupos experimentales en los que se encontraron.

6. Resultados

6.1 Efecto de la curcumina en los parámetros funcionales del músculo extensor radial del carpo

Sacudida simple

Fuerza máxima de sacudida simple



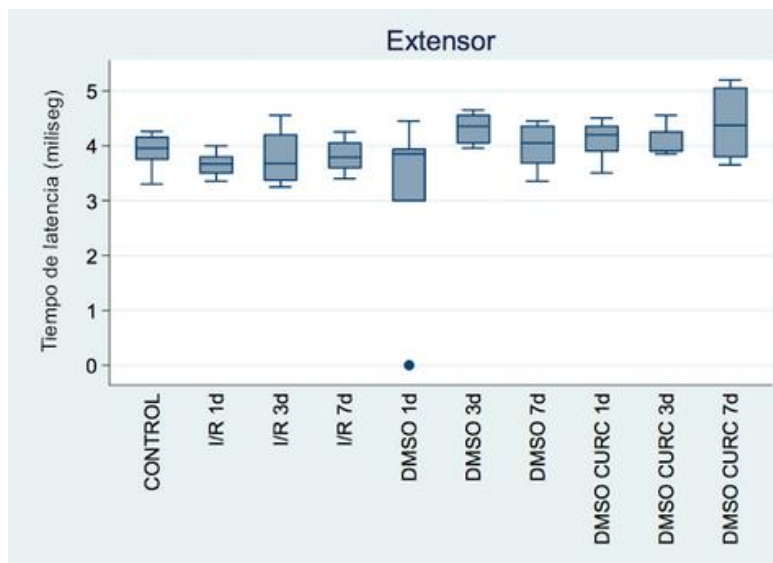
Gráfica 6. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la fuerza máxima de sacudida simple en músculo ERLC (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales). Se encuentra en esta gráfica que la media de la fuerza desarrollada por el músculo ERLC en el grupo control (19,3320 g) fue significativamente mayor a la desarrollada por los grupos I/R 1d (7,9380 g), I/R DMSO 1d (6,0100 g), e I/R DMSO CURC 1d (5,2780 g). No se encontraron diferencias significativas entre la media de la fuerza desarrollada por el grupo control y los grupos I/R 7d (20,2840 g), I/R DMSO 7d (20,6440 g), I/R DMSO CURC 3d (13,3700 g) e I/R DMSO CURC 7d (21,2017 g). Las medias de los grupos I/R DMSO 3d (9,1060 g) y I/R 3d (8,1725 g), aunque estadísticamente tienen valores de p mayores a 0,05 (0,058 y 0,077 respectivamente) y por tanto no tendrían diferencias con el grupo control, se consideraron en el presente trabajo como medidas marginales.

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre la media de la fuerza desarrollada por los grupos I/R 1d, I/R DMSO 1d e I/R DMSO CURC 1d.

Entre los grupos experimentales de 3 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 3d, I/R DMSO 3d e I/R DMSO CURC 3d. Es importante aclarar en este punto que el grupo I/R DMSO CURC 3d, pese a que no muestra diferencia significativa con el grupo control ($p=1.0$) en esta variable, tampoco muestra diferencia significativa con los otros grupos de recuperación a los tres días, asunto que podría explicarse porque este grupo experimental (I/R DMSO CURC 3d), tiene la desviación típica más alta de todos los grupos para esta variable (7,92635 g).

Entre los grupos experimentales de 7 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d.

Tiempo de latencia

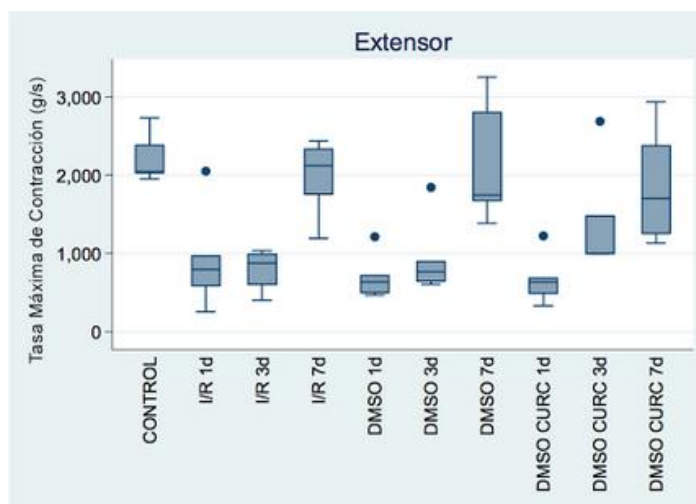


Gráfica 7. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto el tiempo en segundos que tarda en iniciar la pendiente de ascenso tras la sacudida simple en músculo ERLC (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales).

Se encuentra en esta gráfica que la media del tiempo en segundos que tarda en iniciar la pendiente de ascenso tras la sacudida simple en el músculo ERLC en el grupo control (3,9 ms) no tuvo diferencias significativas con ninguno de los otros grupos experimentales

No se encontró diferencia significativa entre los grupos que tuvieron 1 día de recuperación (I/R 1d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO CURC 1d), tampoco entre los grupos que tuvieron 3 días de recuperación (I/R 3d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 3d), ni entre los grupos que tuvieron 7 días de recuperación (I/R 7d, I/R DMSO 7d, I/R DMSO CURC 7d).

Tasa máxima de contracción en sacudida simple



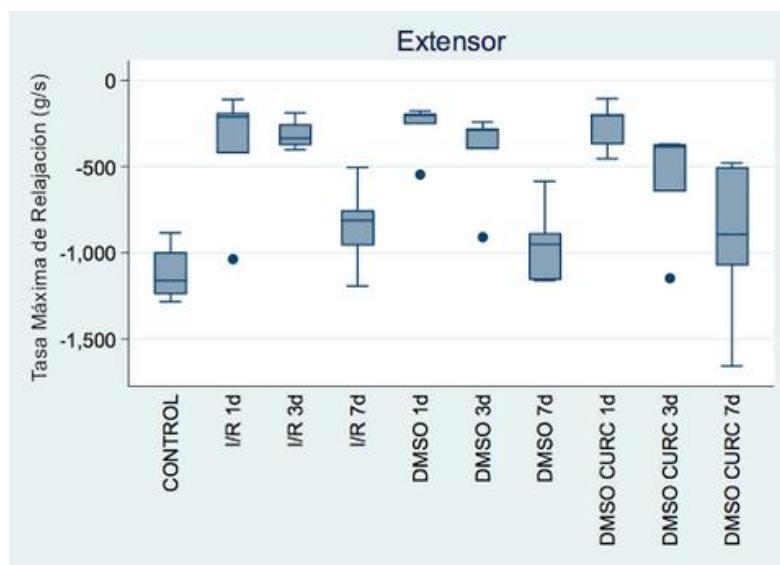
Gráfica 8. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto tasa máxima de contracción desarrollada durante la sacudida simple en músculo ERLC (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales). Se encuentra en esta gráfica que la tasa máxima de contracción desarrollada durante la sacudida simple del músculo ERLC en el grupo control (2228,3 g/s) fue significativamente mayor a la desarrollada por los grupos I/R 1d (930,8300 g/s), I/R 3d (796,1775 g/s), I/R DMSO 1d (707,0800 g/s), I/R DMSO 3d (950,3540 g/s) e I/R DMSO CURC 1d (672,7000 g/s). No se encontraron diferencias significativas entre la media de la pendiente de ascenso del grupo control y los grupos I/R 7d (1967,1400 g/s), I/R DMSO 7d (2172,5200 g/s), I/R DMSO CURC 3d (1431,2960 g/s) e I/R DMSO CURC 7d (1851,4667 g/s).

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación, no se encontraron diferencias significativas en la media de la pendiente de ascenso entre los grupos I/R 1d, I/R DMSO 1d e I/R DMSO CURC 1d.

Entre los grupos experimentales de 3 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 3d, I/R DMSO 3d e I/R DMSO CURC 3d. Al igual que para la variable anteriormente descrita, el grupo I/R DMSO CURC 3d, pese a que no muestra diferencia significativa con el grupo control, tampoco muestra diferencia significativa con los otros grupos de recuperación a los tres días, asunto que podría explicarse porque este grupo experimental (I/R DMSO CURC 3d), tiene una desviación típica alta (731,88464 g/s), la segunda más alta de todos los grupos para esta variable, después del grupo I/R DMSO 7d.

Entre los grupos experimentales de 7 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d.

Tasa máxima de relajación en sacudida simple



Con formato: Fuente: Borda: : (Sin
borde)

Con formato: Color de fuente:
Automático

Gráfica 9. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto tasa máxima de relajación desarrollada durante la sacudida simple en músculo ERLC (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales).. Se encuentra en esta gráfica que la tasa máxima de relajación desarrollada durante la sacudida simple del músculo ERLC en el grupo control (-1113,0660 g/s) fue significativamente mayor a la desarrollada por los grupos I/R 1d (-394,0500 g/s), I/R 3d (-315,7600 g/s), I/R DMSO 1d (-275,1380 g/s), I/R DMSO 3d (-423,2860 g/s) e I/R DMSO CURC 1d (-266,3220 g/s). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos I/R 7d (-843,3920 g/s), I/R DMSO 7d (-947,7480 g/s), I/R DMSO CURC 3d (-583,1260 g/s) e I/R DMSO CURC 7d (-916,8883 g/s).

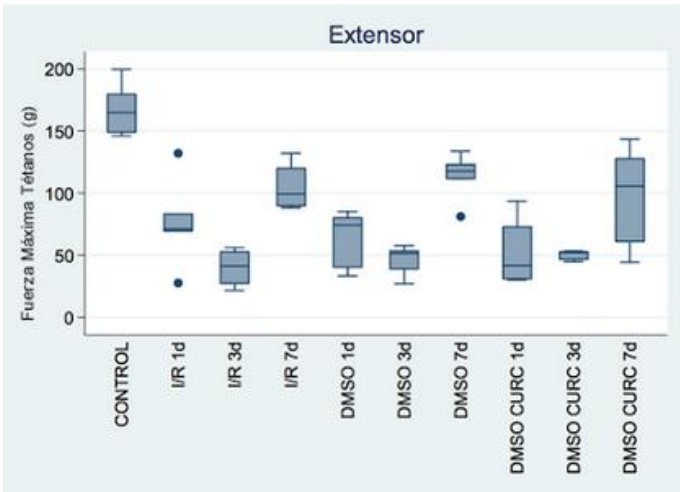
Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 1d, I/R DMSO 1d e I/R DMSO CURC 1d.

Entre los grupos experimentales de 3 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 3d, I/R DMSO 3d e I/R DMSO CURC 3d. Al igual que para las variable anteriormente descrita, el grupo I/R DMSO CURC 3d, pese a que no muestra diferencia significativa con el grupo control, tampoco muestra diferencia significativa con los otros grupos de recuperación a los tres días, asunto que podría explicarse porque este grupo experimental (I/R DMSO CURC 3d), tiene una desviación típica alta (334,79802 g/s).

Entre los grupos experimentales de 7 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d.

Tétanos

Fuerza máxima en contracción tetánica



Gráfica 10. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la fuerza máxima durante la estimulación tetánica en músculo ERLC (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores

encontradas en algunos grupos experimentales). Se encuentra en esta gráfica que la media de la fuerza máxima durante la estimulación tetánica del músculo ERLC en el grupo control (167,8 g) fue significativamente mayor a la desarrollada por todos los grupos experimentales, a excepción del grupo I/R DMSO 7d.

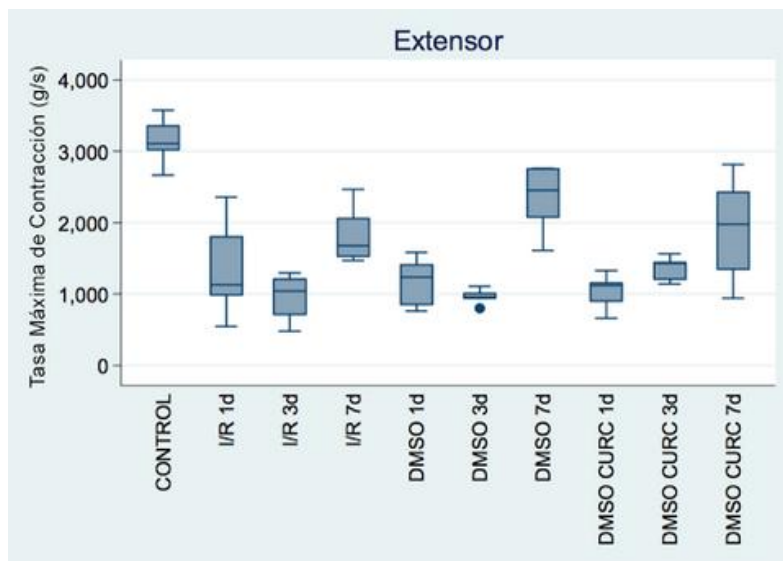
Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación, no se encontraron diferencias significativas en la media de la fuerza máxima entre los grupos I/R 1d, I/R DMSO 1d e I/R DMSO CURC 1d.

Entre los grupos experimentales de 3 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 3d, I/R DMSO 3d e I/R DMSO CURC 3d.

Entre los grupos experimentales de 7 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d.

Aunque por la prueba de Bonferroni el grupo I/R DMSO 7d fue el único grupo que no mostró diferencia significativa con el control en esta variable, tampoco se encuentran por dicha prueba diferencias entre I/R DMSO 7d y los otros grupos experimentales que tuvieron recuperación por 7 días. Se observa por la prueba de Duncan que pese al resultado obtenido por la prueba de Bonferroni, el grupo control no se encuentra en el mismo clúster que el grupo I/R DMSO 7d.

Tasa máxima de contracción tetánica



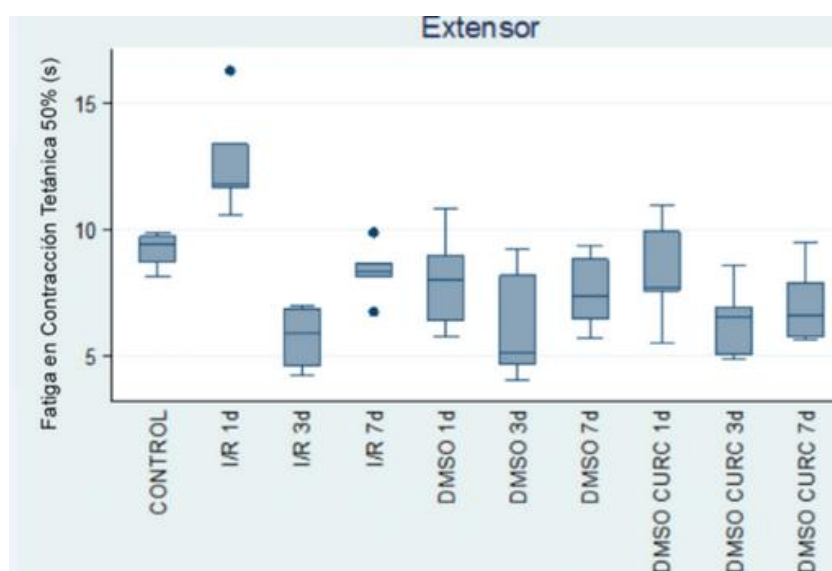
Gráfica 11. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la tasa máxima de contracción desarrollada durante la estimulación tetánica en músculo ERLC (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales). Se encuentra en esta gráfica que la tasa máxima de contracción desarrollada durante la estimulación tetánica del músculo ERLC en el grupo control (3146,0 g/s) fue significativamente mayor a la desarrollada por todos los grupos experimentales a excepción del grupo I/R DMSO 7d.

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 1d, I/R DMSO 1d e I/R DMSO CURC 1d.

Entre los grupos experimentales de 3 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 3d, I/R DMSO 3d e I/R DMSO CURC 3 d.

Entre los grupos experimentales de 7 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d. Al igual que para la variable anteriormente descrita y aunque por la prueba de Bonferroni el grupo I/R DMSO 7d fue el único grupo que no mostró diferencia significativa con el control en esta variable, tampoco se encuentran por dicha prueba diferencias entre I/R DMSO 7d y los otros grupos experimentales que tuvieron recuperación por 7 días. Se observa por la prueba de Duncan que pese al resultado obtenido por la prueba de Bonferroni, el grupo control no se encuentra en el mismo clúster que el grupo I/R DMSO 7d.

Fatiga en contracción tetánica



Gráfica 12. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la Fatiga en contracción tetánica (tiempo en segundos en el cual la fuerza cae en un 50% de la fuerza máxima) en músculo ERLC (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos

grupos experimentales). Se encuentra en esta gráfica que el tiempo en segundos cae en un 50% en músculo ERLC en el grupo control (9,19 s) no presentó diferencias significativas con ninguno de los otros grupos experimentales.

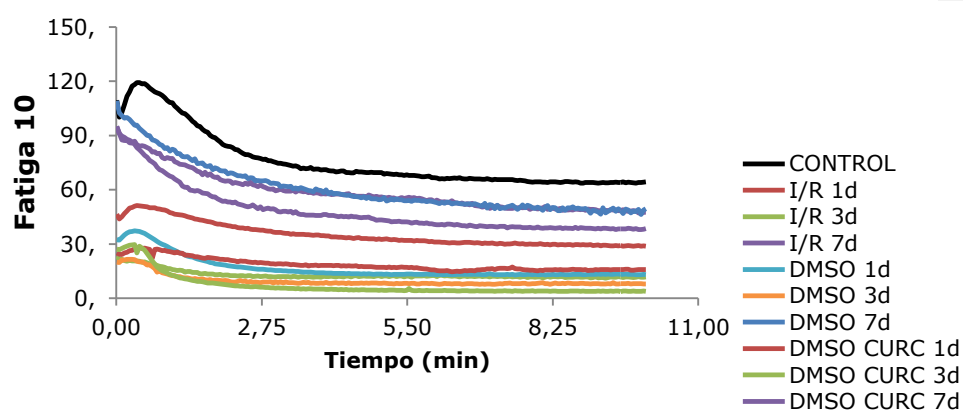
Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación, se encontró que la media del grupo I/R 1d (12,75 s), fue significativamente mayor a las de los grupos I/R DMSO CURC 1d (8,33 s) e I/R DMSO 1d (7,98 s), viéndose que estos dos últimos grupos no tuvieron diferencias entre sí.

Entre los grupos experimentales de 3 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 3d, I/R DMSO 3d e I/R DMSO CURC 3 d. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales de 7 días de recuperación (I/R 7d, I/R DMSO 7d, I/R DMSO CURC 7d).

Variables numéricas con seguimiento en el tiempo en músculo extensor radial del carpo (ERLC)

Tiempos de fatiga

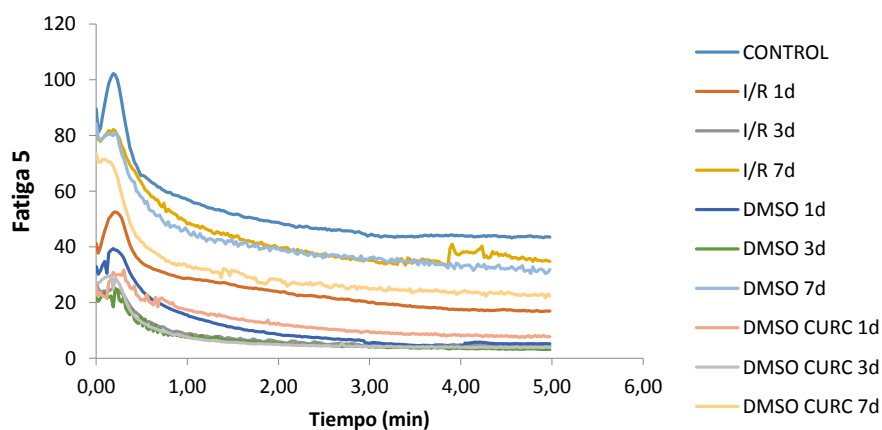
Tiempo de fatiga 10 minutos



Gráfica 13. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la caída continua de la fuerza tras una estimulación constante, en un tiempo de 10 minutos en músculo ERLC. Se encuentra en esta gráfica que la caída continua de la fuerza tras una estimulación constante, en un tiempo de 10 minutos en el músculo ERLC en el grupo control fue significativamente menor que en los grupos I/R 1d, I/R 3d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 1d e I/R DMSO CURC 3d; encontrándose que no hubo diferencia significativa en la caída de la fuerza entre el grupo control y los grupos I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d.

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación (I/R 1d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO CURC 1d), se encontró que no hubo diferencia significativa respecto a esta variable, tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos de 3 días de recuperación (I/R 3d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 3d) ni entre los grupos de 7 días de recuperación (I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d).

Tiempo de fatiga 5 minutos



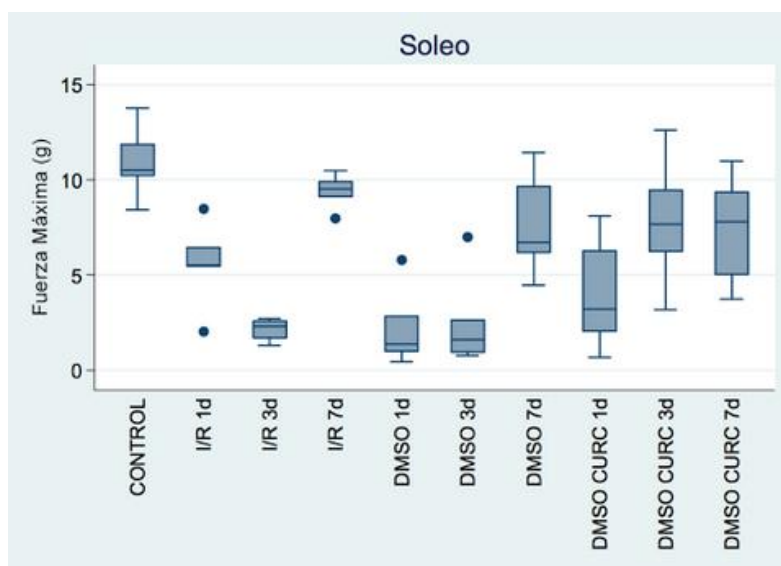
Gráfica 14. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la caída continua de la fuerza tras una estimulación constante, en un tiempo de 5 minutos en músculo ERLC. Se encuentra en esta gráfica que la caída continua de la fuerza tras una estimulación constante, en un tiempo de 5 minutos en el músculo ERLC en el grupo control fue significativamente menor que en los grupos I/R 1d, I/R 3d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 1d, I/R DMSO CURC 3d e I/R DMSO CURC 7d encontrándose que no hubo diferencia significativa en la caída de la fuerza entre el grupo control y los grupos I/R 7d e I/R DMSO 7d.

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación (I/R 1d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO CURC 1d), se encontró que no hubo diferencia significativa respecto a esta variable, tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos de 3 días de recuperación (I/R 3d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 3d) ni entre los grupos de 7 días de recuperación (I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d).

6.2 Efecto de la curcumina en parámetros funcionales del músculo soleo

Sacudida simple

Fuerza máxima en sacudida simple



Gráfica 15. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la fuerza máxima de sacudida simple en músculo soleo (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales). Se encuentra en esta gráfica que la media de la fuerza máxima desarrollada en una sacudida simple por el músculo soleo en el grupo control (10,9480 g) fue significativamente mayor a la desarrollada por los grupos I/R 1d (5,5840 g), I/R 3d (2,1475 g), I/R DMSO 1d (2,2920 g), I/R DMSO 3d (2,5920 g) e I/R DMSO CURC 1d (4,0560g). No se encontraron diferencias significativas entre la

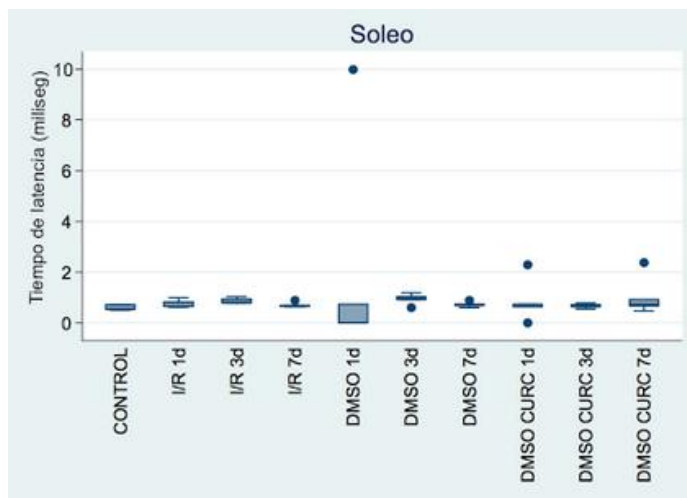
media de la fuerza desarrollada por el grupo control y los grupos I/R 7d (9,3980 g), I/R DMSO 7d (7,6920 g), I/R DMSO CURC 3d (7,8320 g) e I/R DMSO CURC 7d (7,4467 g).

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre la media de la fuerza desarrollada por los grupos I/R 1d, I/R DMSO 1d e I/R DMSO CURC 1d.

Entre los grupos experimentales de 3 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 3d, I/R DMSO 3d e I/R DMSO CURC 3d. Es importante aclarar en este punto que el grupo I/R DMSO CURC 3d, pese a que no muestra diferencia significativa con el grupo control en esta variable, tampoco muestra diferencia significativa con los otros grupos de recuperación a los tres días, asunto que podría explicarse porque este grupo experimental (I/R DMSO CURC 3d), tiene la desviación típica más alta de todos los grupos para esta variable (3,51630 g).

Entre los grupos experimentales de 7 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d.

Tiempo de latencia

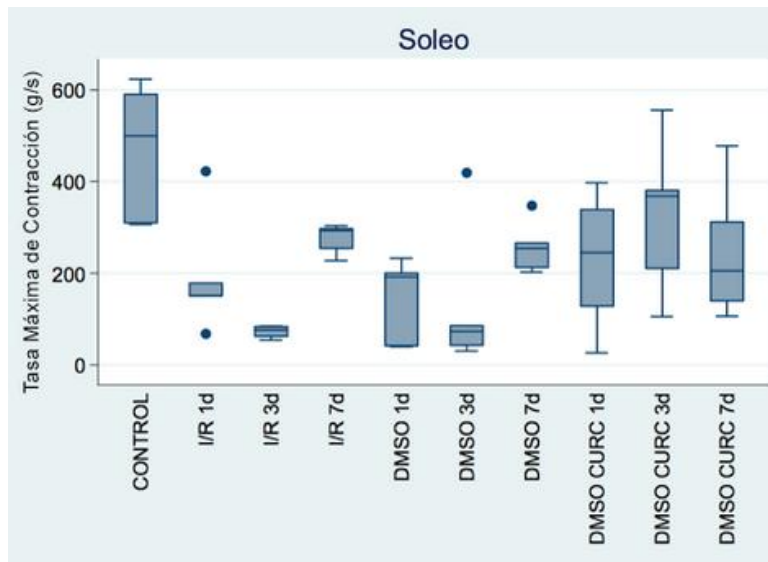


Gráfica 16. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto el tiempo en segundos que tarda en iniciar la pendiente de ascenso tras la sacudida simple en músculo soleo (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales).

Se encuentra en esta gráfica que el tiempo en segundos que tarda en iniciar la pendiente de ascenso tras la sacudida simple en el músculo soleo en el grupo control es de (6,0 ms) no tuvo diferencias significativas con ninguno de los otros grupos experimentales.

No se encontró diferencia significativa entre los grupos que tuvieron 1 día de recuperación (I/R 1d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO CURC 1d), tampoco entre los grupos que tuvieron 3 días de recuperación (I/R 3d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 3d), ni entre los grupos que tuvieron 7 días de recuperación (I/R 7d, I/R DMSO 7d, I/R DMSO CURC 7d).

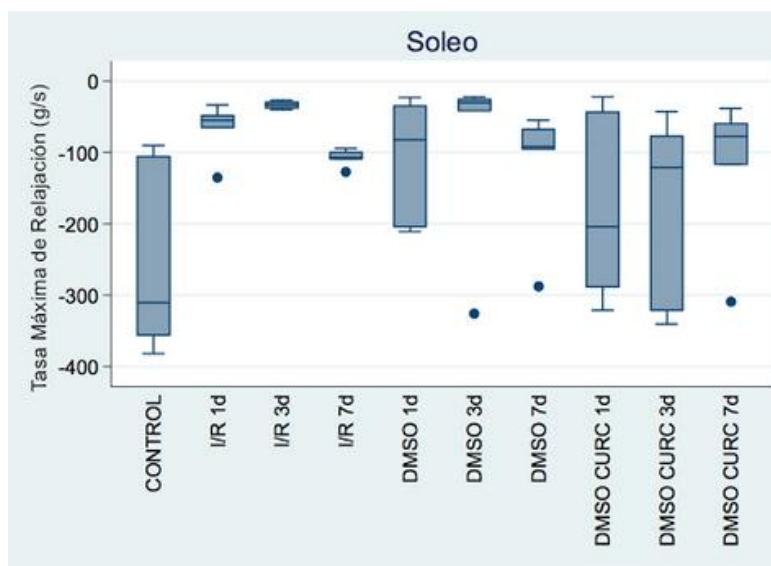
Tasa máxima de contracción en sacudida simple



Gráfica 17. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto tasa máxima de contracción desarrollada durante la sacudida simple en músculo soleo (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales). Se encuentra en esta gráfica que la pendiente de ascenso de la fuerza desarrollada durante la sacudida simple del músculo soleo en el grupo control (466,1440 g/s) fue significativamente mayor a la desarrollada por los grupos I/R 1d (194,04g/s), I/R 3d (72,7150 g/s), I/R DMSO 1d (141,1560 g/s) e I/R DMSO 3d (130,0260 g/s); encontrándose que no hubo diferencias significativas entre la media del grupo control y los grupos I/R 7d (275,0180g/s), I/R DMSO 7d (256,4820g/s), I/R DMSO CURC 1d (227,1940g/s), I/R DMSO CURC 3d (323,9560g/s) e I/R DMSO CURC 7d (240,7533 g/s)

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación (I/R 1d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO CURC 1d), se encontró que no hubo diferencia significativa respecto a esta variable, tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos de 3 días de recuperación (I/R 3d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 3d) ni entre los grupos de 7 días de recuperación (I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d).

Tasa máxima de relajación en sacudida simple

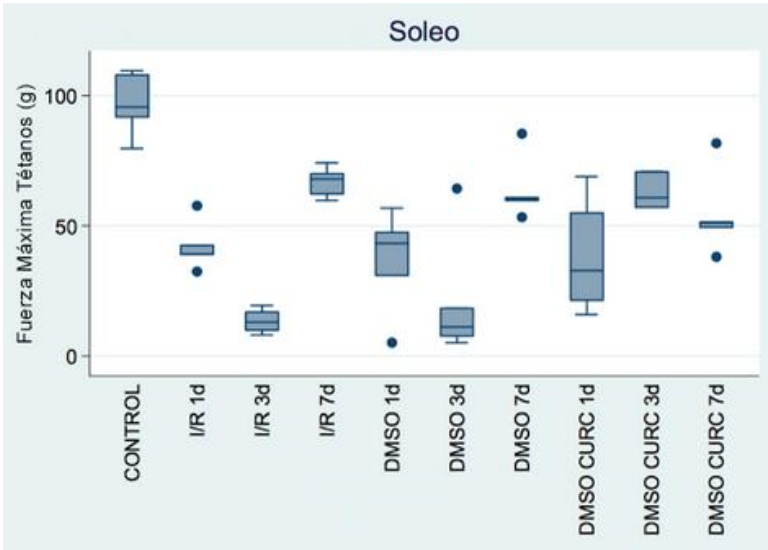


Gráfica 18. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto tasa máxima de relajación desarrollada durante la sacudida simple en músculo (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales). Se encuentra en esta gráfica que la pendiente de descenso de la fuerza desarrollada durante la sacudida simple del músculo soleo en el grupo control (-249,1120 g/s) no tuvo diferencias significativas con ninguno de los otros grupos experimentales.

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación (I/R 1d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO CURC 1d), se encontró que no hubo diferencia significativa respecto a esta variable, tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos de 3 días de recuperación (I/R 3d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 3d) ni entre los grupos de 7 días de recuperación (I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d).

Tétanos

Fuerza máxima en contracción tetánica



Gráfica 19. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la fuerza máxima durante la estimulación tetánica en músculo soleo (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales). Se encuentra en esta gráfica que la media de la fuerza máxima desarrollada durante la estimulación tetánica del músculo

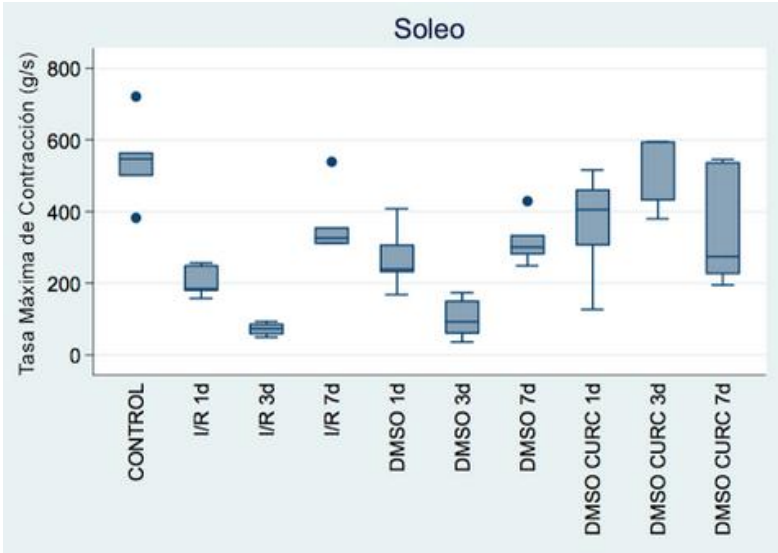
soleo en el grupo control (96,890 g) fue significativamente mayor a la desarrollada por todos los grupos experimentales, a excepción los grupos I/R 7d (66,7604 g) e I/R DMSO 7d (63,832 g).

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 1d, I/R DMSO 1d e I/R DMSO CURC 1d.

Entre los grupos experimentales de 3 días de recuperación, se encontró que la media del grupo I/R DMSO CURC 3d (63,280g) fue significativamente mayor a la desarrollada por los grupos I/R 3d (13,2980g) e I/R DMSO 3d (21,294160 g).

Entre los grupos experimentales de 7 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas en la media de la pendiente de ascenso entre los grupos I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d.

Tasa Máxima de contracción tetánica



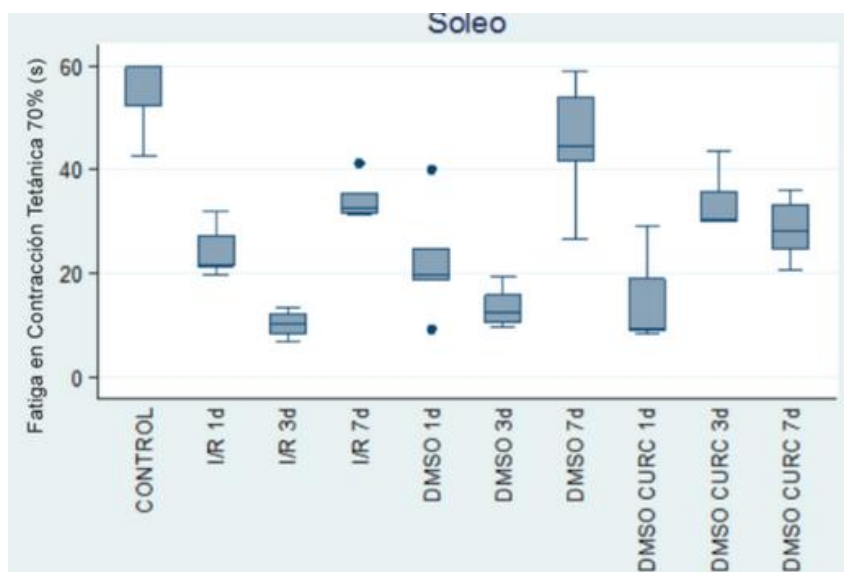
Gráfica 20. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la tasa máxima de contracción desarrollada durante la estimulación tetánica en músculo soleo (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales). Se encuentra en esta gráfica que la pendiente de ascenso de la fuerza desarrollada durante la estimulación tetánica del músculo soleo en el grupo control (543,04 g/s) fue significativamente mayor a la desarrollada por los grupos experimentales I/R 1d (205,6124 g/s), I/R 3d (72,085 g/s), I/R DMSO 1d (270,2672g/s) e I/R DMSO 3d (102,70208 g/s); encontrándose que no tuvo diferencias significativas con los grupos I/R 7d (368,368 g/s), I/R DMSO 7d (318,648 g/s), I/R DMSO CURC 1d (362,5512 g/s), I/R DMSO CURC 3d (486,57 g/s) e I/R DMSO CURC 7d (342,1694 g/s).

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación, no se encontraron diferencias significativas en la media de la tasa máxima de contracción tetánica entre los grupos I/R 1d, I/R DMSO 1d e I/R DMSO CURC 1d.

Entre los grupos experimentales de 3 días de recuperación, la media del grupo I/R DMSO CURC 3d (362,5512 g/s) fue significativamente mayor a la desarrollada por los grupos I/R 3d (72,08 g/s) e I/R DMSO 3d (102,702g/s).

Entre los grupos experimentales de 7 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas en la media de la pendiente de ascenso entre los grupos I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d.

Fatiga en contracción tetánica



Gráfica 21. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la Fatiga en contracción tetánica (tiempo en segundos en el cual la fuerza cae en un 70% de la fuerza máxima) en músculo soleo (los puntos aislados en la figura demarcan mediciones atípicas tanto superiores como inferiores encontradas en algunos grupos experimentales) Se encuentra en esta gráfica que el tiempo en disminuir un 70% la fuerza inicial del músculo soleo en el grupo control (54,9 s) presentó diferencias significativas con todos los grupos experimentales, a excepción del grupo I/R DMSO 7d (45,1 s).

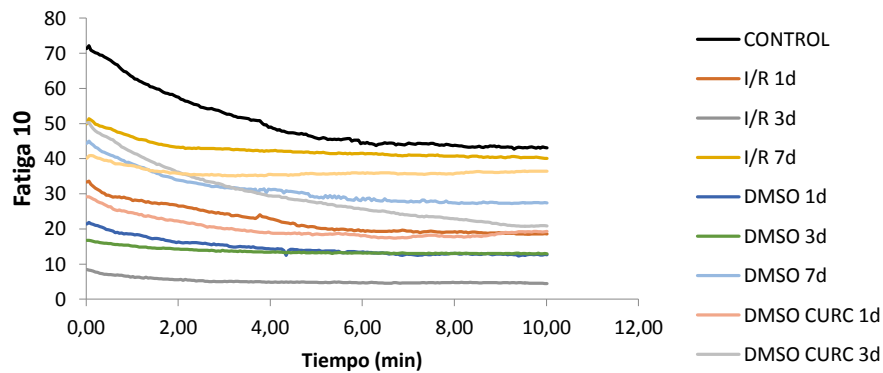
Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 1d, I/R DMSO 1d e I/R DMSO CURC 1d.

Entre los grupos experimentales de 3 días de recuperación, la media del grupo I/R DMSO CURC 3d (33,8 s) fue significativamente mayor a la desarrollada por los grupos I/R 3d (10,1 s) e I/R DMSO 3d (13,50 s)

Entre los grupos experimentales de 7 días de recuperación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d.

Variables numéricas con seguimiento en el tiempo en músculo soleo

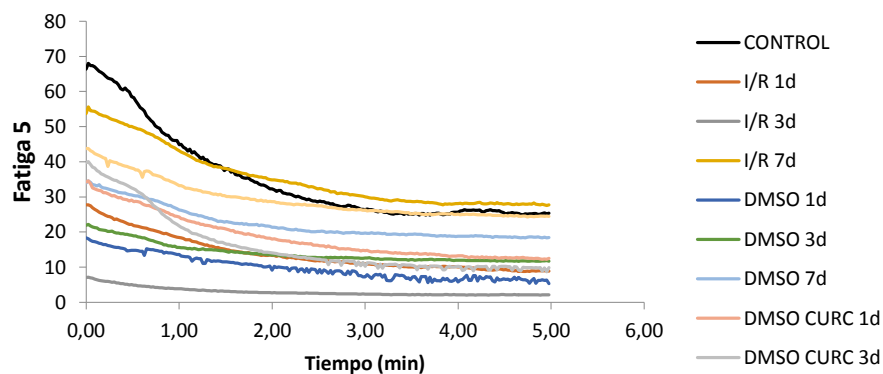
Tiempo de fatiga 10 minutos



Gráfica 22. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la caída continua de la fuerza tras una estimulación constante, en un tiempo de 10 minutos en músculo soleo. Se encuentra en esta gráfica que la caída continua de la fuerza tras una estimulación constante, en un tiempo de 10 minutos en el músculo soleo en el grupo control fue significativamente menor que en los grupos I/R 3d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 1d; encontrándose que no hubo diferencia significativa en la caída de la fuerza entre el grupo control y los grupos I/R 1d, I/R 7d, I/R DMSO 7d, I/R DMSO CURC 3d e I/R DMSO CURC 7d.

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación (I/R 1d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO CURC 1d), se encontró que no hubo diferencia significativa respecto a esta variable, tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos de 3 días de recuperación (I/R 3d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 3d) ni entre los grupos de 7 días de recuperación (I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d).

Tiempo de fatiga 5 minutos



Gráfica 23. Comparación entre los 10 grupos experimentales respecto a la caída continua de la fuerza tras una estimulación constante, en un tiempo de 10 minutos en músculo soleo Se encuentra en esta gráfica que la caída continua de la fuerza tras una estimulación constante, en un tiempo de 5 minutos en el músculo soleo en el grupo control fue significativamente menor que en todos los grupos experimentales a excepción de los grupos I/R 3d e I/R DMSO 1d.

Entre los grupos experimentales de 1 día de recuperación (I/R 1d, I/R DMSO 1d, I/R DMSO CURC 1d), se encontró que no hubo diferencia significativa respecto a esta variable, tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos de 3 días de recuperación (I/R 3d, I/R DMSO 3d, I/R DMSO CURC 3d) ni entre los grupos de 7 días de recuperación (I/R 7d, I/R DMSO 7d e I/R DMSO CURC 7d).

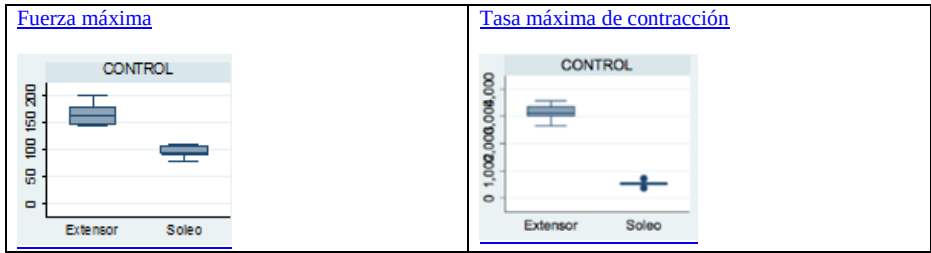
6.3 Comparación de los efectos de la curcumina en los parámetros funcionales entre el músculos soleo y el extensor radial del carpo



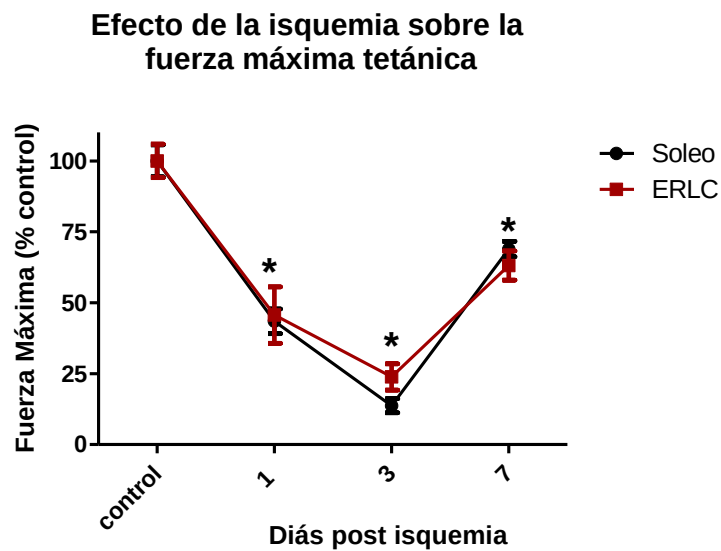
Comparación sacudida simple

Gráfica 24. Comparación en sacudida simple músculos ERLC y soleo. Se observa que el músculo ERLC desarrolla más fuerza (19,3320 g), mayor tasa máxima de contracción (2228,3000 g/s) y de relajación (-1113,0660 g/s) que el músculo soleo (10,9480 g, 466,1440 g/s y -249,1120 g/s respectivamente), al ser el músculo ERLC predominantemente glucolítico (rápido) y el soleo predominantemente oxidativo (lento).

Comparación contracción tetánica

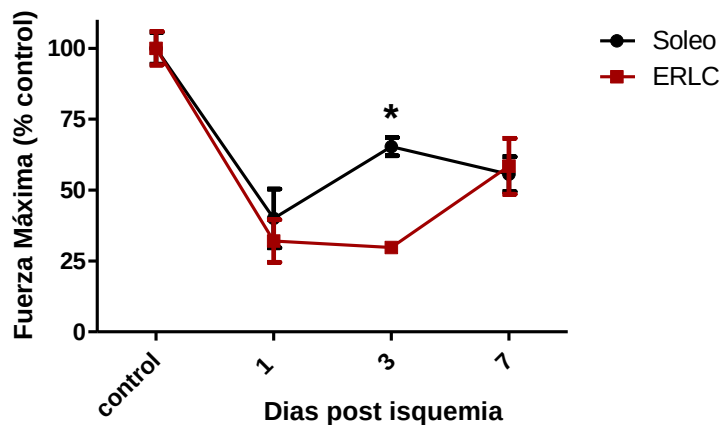


Gráfica 25. Comparación en contracción tetánica entre ERLC y soleo. Igualmente, para tetanos el músculo ERLC alcanza valores más altos de fuerza máxima (167,8 g) y de tasa máxima de contracción (3146) que el músculo soleo (96,89 g y 543 g/s respectivamente), al ser el ERLC de predominio glucolítico (rápido) Vs. El soleo (de predominio oxidativo o lento).



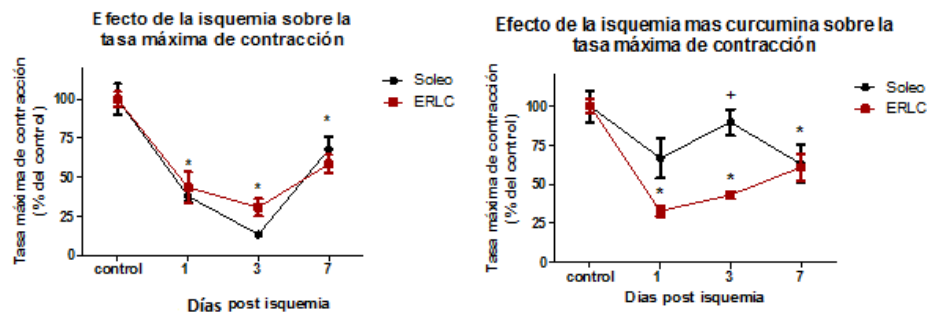
Gráfica 26. Comparación del efecto de la isquemia sobre la fuerza máxima desarrollada por los músculos ERLC y soleo tras estimulación tetánica. * Diferencia significativa ($p < 0,05$) frente al grupo control. Se observa que para el músculo ERLC hubo diferencia significativa en el desarrollo de la fuerza máxima frente al grupo control después de 1 día (desarrollando el 46% de fuerza en comparación con el control), 3 días (desarrollando el 24% de fuerza en comparación con el control) y 7 días (desarrollando el 63% de fuerza en comparación con el control). Para el músculo soleo se encontró hubo diferencia significativa en el desarrollo de la fuerza máxima frente al grupo control después de 1 día (desarrollando el 43% de fuerza en comparación con el control) y 3 días (desarrollando el 14% de fuerza en comparación con el control), mientras que no se encontró diferencia significativa frente al grupo control después de 7 días de reperusión (desarrollando el 69% de fuerza en comparación con el control).

Efecto de la isquemia más curcumina sobre la fuerza máxima tetánica



Gráfica 27. Comparación del efecto de la administración de curcumina sobre la fuerza máxima desarrollada por los músculos ERLC y soleo tras estimulación tetánica. *

Diferencia significativa ($p < 0,05$) entre músculo extensor y soleo. Se observa, después de 1 día de reperusión, que tras la administración de curcumina, la fuerza máxima desarrollada por el músculo ERLC (40% respecto a la desarrollada por el grupo control) y por el músculo soleo (32% respecto a la desarrollada por el grupo control), no presentan diferencias significativas. Después de 3 días de reperusión la fuerza máxima desarrollada por el músculo ERLC (30% respecto a la desarrollada por el grupo control) y por el músculo soleo (65% respecto a la desarrollada por el grupo control), presentaron diferencias significativas. Después de 7 días de reperusión, la fuerza máxima desarrollada por el músculo ERLC (58% respecto a la desarrollada por el grupo control) y por el músculo soleo (56% respecto a la desarrollada por el grupo control), no presentan diferencias significativas.



Gráfica 28. Efecto comparativo de la isquemia sobre la tasa máxima de contracción tetánica en músculos ERLC y soleo con y sin aplicación de curcumina después de 1,3 y 7 días post reperusión. (* diferencias significativas con el grupo control, +diferencias significativas entre músculos, p significativa <0.05). Se observa que tras la isquemia hay disminución de la tasa máxima de contracción tetánica significativa respecto al grupo control en todos los días de reperusión para ambos tipos de músculo, con especial caída al tercer día (69% para el músculo ERLC y 87% para el músculo soleo respecto al grupo control). Tras la administración de curcumina se encuentra diferencia significativa entre los músculos ERLC y soleo al tercer día de reperusión (caída del soleo 33% y del ERLC del 57% respecto al grupo control).

7. Discusión

Recuperación del músculo glucolítico y oxidativo posterior a la lesión por isquemia reperusión.

Aunque se ha reportado en la literatura que tras la lesión por isquemia reperusión se manifiesta daño histológico progresivo, observándose que después de una isquemia de 4

horas se encuentra a las 24 horas de reperusión infiltrado inflamatorio intenso en el endomisio y el perimisio y tras 72 horas de reperusión se han observado áreas con infiltrado inflamatorio y fibras musculares en diferentes estados de necrosis y fagocitosis [14], no existen reportes en la literatura de los cambios en el tiempo de la función muscular después de la lesión por isquemia reperusión.

En cuanto a la **sacudida simple**, en nuestro trabajo encontramos que después de un día de reperusión tras una isquemia de dos horas de duración, tanto en el músculo ERLC como en el músculo soleo hubo una disminución de la fuerza máxima, siendo la fuerza máxima en ERLC de 41% y en soleo del 51% respecto a la del control. También se observó que para la tasa máxima de contracción, hubo una caída tanto en el ERLC y en el soleo, desarrollando ambos sólo un 42% respecto a la del control. Para la tasa máxima de relajación se evidenció una caída frente al control del 35% para el ERLC, mientras que en el músculo soleo, fue del 27% respecto a la del control. En cuanto al tiempo de latencia, no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo control ni para el ERLC ni para el soleo. Con lo anterior se concluye que tras la isquemia y un día de recuperación, el músculo glucolítico se vio más afectado que el músculo oxidativo en la respuesta funcional de sacudida simple, correspondiendo con las observaciones de que el músculo glucolítico tiene un mayor escape de ROS mitocondriales y una capacidad antioxidante inferior a la del músculo soleo [23].

A los tres días de reperusión tras una isquemia de 2 horas, encontramos en nuestro trabajo que en el músculo ERLC no hubo diferencia significativa en la fuerza máxima respecto al grupo control, aunque con un valor de p de 0,056, que se consideró marginal; en cambio en el músculo soleo, hubo una fuerza máxima de apenas un 20% en comparación con la fuerza desarrollada por el control. Con este hallazgo se sugiere

que hay en el músculo soleo una correspondencia con los hallazgos histológicos reportados a las 72 horas [14], mientras que el músculo extensor alcanzaría una fuerza máxima más cercana al control. Para la tasa máxima de contracción, la fuerza desarrollada por el ERLC fue del 35% y la del soleo del 15% respecto a la desarrollada por el control, siendo consistente este hallazgo con el empeoramiento a los tres días de la fuerza máxima alcanzada por el soleo reportada anteriormente. Para la tasa máxima de relajación se evidenció una caída frente al control del 72% para el ERLC, mientras que en el músculo soleo, no hubo diferencias con el control. En cuanto al tiempo de latencia, no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo control ni para el ERLC ni para el soleo. Se observa entonces que después de tres días de reperusión, hay un mayor compromiso en el músculo oxidativo que en el músculo glucolítico, sugiriendo que hay en el músculo soleo una correspondencia con los hallazgos histológicos reportados a las 72 horas [14].

A los siete días de reperusión, tras una isquemia de 2 horas, encontramos en nuestro trabajo que no hubo diferencias frente al grupo control ni en el músculo ERLC ni en el músculo soleo en las variables: fuerza máxima, tasa máxima de contracción, tasa máxima de relajación y tiempo de latencia, con lo que podría inferirse que a los siete días de reperusión, la recuperación en la sacudida simple en ambos músculos no presentó diferencias significativas con el grupo control; esta información la consideramos de relevancia, dado el déficit de publicaciones al respecto de la temporalidad en el daño funcional del músculo esquelético tras la lesión por isquemia reperusión.

En cuanto a la **estimulación tetánica**, encontramos en nuestro trabajo que después de un día de reperusión tras una isquemia de dos horas de duración, tanto en el músculo ERLC como en el músculo soleo hubo una disminución de la fuerza máxima, siendo la fuerza máxima en ERLC de 46% y la del soleo de 43% respecto a la desarrollada por el control. También se observó que para la tasa máxima de contracción, que tanto en el ERLC como en el soleo, desarrollaron fuerza significativamente menor a la del control 43% y el 38% respectivamente frente a la desarrollada por control. En cuanto a la fatiga en contracción tetánica, encontramos diferencia significativa frente al grupo control para el músculo soleo, con una caída 56% más rápida en el tiempo, mientras que para el músculo ERLC no encontramos diferencias significativas frente al control.

A diferencia de lo que observamos para sacudida simple después de un día de reperusión, en la tensión tetánica no se encuentran diferencias significativas entre ambos músculos respecto a su respuesta funcional.

Después de tres días de reperusión tras una isquemia de dos horas de duración, tanto en el músculo ERLC como en el músculo soleo hubo una disminución de la fuerza máxima, siendo la fuerza máxima de ERLC del 24% la del soleo del 14% respecto a la desarrollada por el control. También se observó que para la tasa máxima de contracción, la de ERLC y la del soleo fueron del 31% y el 13% respectivamente frente a la desarrollada por el control. En cuanto a la fatiga en contracción tetánica, encontramos diferencia significativa frente al grupo control para el músculo soleo, con una caída 82% más rápida en el tiempo, mientras que para el músculo ERLC no encontramos diferencias significativas frente al control; corroborando que tres días post lesión, el efecto de la disminución de la fuerza es más pronunciado en músculo oxidativo que en músculo glucolítico.

Después de siete días de reperusión tras una isquemia de dos horas de duración, se encontró que para el músculo ERLC hubo diferencias significativas respecto a la fuerza máxima (63% respecto a la desarrollada por el control) y tasa máxima de contracción tras la estimulación tetánica (58% respecto a la desarrollada por el control), sin diferencias respecto a la fatiga tras estimulación tetánica. Para el músculo soleo en cambio, se encontró que no hubo diferencias significativas frente al control en cuanto a fuerza máxima desarrollada durante la estimulación tetánica, tasa máxima de contracción, ni en fatiga en contracción tetánica.

Respecto al **tiempo de fatiga 10 minutos**, observamos en el músculo ERLC hubo después de un día de reperusión, diferencia significativa entre el grupo I/R 1d y el grupo control (mostrando el grupo I/R 1d mayor fatigabilidad), mientras que para el músculo soleo esta diferencia no se observó. Después de tres días de reperusión hubo diferencia significativa respecto al grupo control tanto por parte del ERLC como del soleo, encontrándose en ambos mayor fatigabilidad. A los siete días después de la reperusión, ni ERLC ni soleo mostraron diferencias significativas respecto en cuanto a la fatigabilidad en este periodo de tiempo frente al control.

Respecto al **tiempo de fatiga 5 minutos**, observamos tanto en el músculo ERLC como en el soleo, que hubo después de un día de reperusión, diferencia significativa entre el grupo I/R 1d y el grupo control, mostrando los grupos I/R 1d mayor fatigabilidad. Después de tres días de reperusión hubo diferencia significativa respecto al grupo control por parte del ERLC (observándose mayor fatigabilidad en el grupo I/R 3d que el control) mientras que esta diferencia no se observó para el soleo. A los siete días después de la reperusión, el músculo ERLC no mostro diferencias significativas en cuanto a su fatigabilidad respecto al grupo control, mientras que sí se vieron estas diferencias en el músculo soleo.

Efecto del dimetil sulfóxido sobre la función muscular

El dimetil sulfóxido (DMSO) es comunmente usado en estudios de músculo esquelético como un antioxidante selectivo (DMSO actúa como atrapador de radicales hidroxilo) o como un solvente para medicamentos. En 1994, Reid y colaboradores reportaron el efecto de DMSO en las propiedades contráctiles del diafragma de ratas, encontrando que el DMSO disminuye la fuerza desarrollada durante una sacudida simple y contracción tetánica submáxima, sin cambiar la fuerza desarrollada en contracción tetánica máxima; estos efectos fueron dosis dependientes y fueron reversibles al lavarse el DMSO [60].

Los autores exponen que el nivel endógeno de ROS influencia la contracción del músculo esquelético tanto de diafragma como de extremidades. Existe evidencia de que los antioxidantes deprimen la fuerza desarrollada por el músculo no fatigado, lo que sugiere que los ROS –en niveles bajos- presentes en el músculo no fatigado, podrían ser esenciales para el acople excitación contracción [60]. En contraste, los antioxidantes inhiben la caída de la fuerza que ocurre en la fatiga aguda, sugiriendo esto que durante la fatiga hay sobre acumulación de estos oxidantes reactivos que puede comprometer la contracción muscular. Los sitios intracelulares de la acción oxidante no se han definido claramente, pero podrían incluir el canal de liberación de calcio y/o la bomba SERCA ATPasa, ya que cada uno de ellos tiene sensibilidad redox reversible [60].

Así mismo, el DMSO tiene evidencia de inhibir la fatiga aguda, por lo que se equiparan sus efectos a los de los compuestos antioxidantes exógenos [60].

En nuestro trabajo utilizamos DMSO como vehículo para curcumina ya que por ser la curcumina un polifenol, tendría una mejor solubilidad que la que podría tener en solución salina. Así mismo, utilizamos DMSO como compuesto único en los grupos I/R

DMSO 1d, I/R DMSO 3d e I/R DMSO 7d, de modo que pudiéramos evidenciar si por acción exclusiva del DMSO podríamos tener cambios en la función muscular después de la lesión por isquemia reperusión.

Con los datos previamente expuestos en nuestros resultados, no podemos observar cambios consistentes en el desarrollo de la fuerza en sacudida simple, estimulación tetánica e índice de fatiga en 10 y 5 minutos en los músculos ERLC y soleo, tras la aplicación de DMSO Vs. La fuerza desarrollada tras la lesión por isquemia reperusión después de uno, tres y siete días de recuperación.

Efecto de la curcumina sobre la función muscular

En cuanto al efecto de la curcumina en el músculo ERLC sobre la **sacudida simple**, encontramos que después de un día de reperusión tras una isquemia de 2 horas, no hubo diferencias con los grupos I/R 1d e I/R DMSO 1d frente a la fuerza máxima desarrollada, tasa máxima de contracción, tasa máxima de relajación y tiempo de latencia.

En cuanto a la aplicación de curcumina en el grupo que tuvo tres días de reperusión tras dos horas de isquemia, el grupo I/R DMSO CURC 3d tampoco tuvo diferencias con los grupos I/R 3d e I/R DMSO 3d frente a la fuerza máxima, tasa máxima de contracción y tasa máxima de relajación. Resulta importante resaltar que el grupo I/R DMSO CURC 3d, tuvo para estas tres variables mencionadas, una desviación típica alta que podría corresponder a un grado de lesión histológica mayor reportado a las 72 horas [14]. No encontramos tampoco diferencias entre el grupo I/R DMSO CURC 3d con los grupos I/R 3d e I/R DMSO 3d frente a los tiempos de latencia.

En cuanto a la aplicación de curcumina en el grupo que tuvo siete días de reperusión tras dos horas de isquemia, el grupo I/R DMSO CURC 7d tampoco tuvo diferencias con los grupos I/R 7d e I/R DMSO 7d frente a la fuerza máxima, tasa máxima de contracción, tasa máxima de relajación y tiempo de latencia, lo que podría sugerir que la recuperación completa de la fuerza desarrollada en la sacudida simple en el músculo ERLC se alcanza sin la aplicación de antioxidantes exógenos.

Respecto a la **estimulación tetánica** en el músculo ERLC, encontramos que después de un día de reperusión tras una isquemia de dos horas, para la fuerza máxima y la tasa máxima de contracción el grupo I/R DMSO CURC 1d no tuvo diferencias significativas con los grupos I/R 1d e I/R DMSO 1d. En la fatiga por contracción tetánica encontramos que el grupo I/R DMSO CURC 1d alcanzó la fatiga en un tiempo significativamente menor que el grupo I/R 1d, mientras que no tuvo diferencias significativas con el grupo I/R DMSO 1d.

En el grupo tratado con curcumina que tuvo tres días de recuperación, no encontramos en este músculo diferencias significativas entre el grupo I/R DMSO CURC 3d y los grupos I/R DMSO 3d e I/R 3d en cuanto a fuerza máxima, tasa máxima de contracción y fatiga tras la estimulación tetánica.

No encontramos tampoco diferencias significativas entre el grupo tratado con curcumina que tuvo siete días de recuperación (I/R DMSO CURC 7d), con los grupos I/R 7d e I/R DMSO 7d frente a la fuerza máxima, tasa máxima de contracción y fatiga tras la estimulación tetánica.

En cuanto al **índice de fatiga en 10 minutos**, encontramos que en el grupo tratado con curcumina no hubo diferencias significativas frente a los grupos I/R e I/R DMSO después de uno, tres y siete días de reperusión tras una isquemia de dos horas.

Así mismo, en cuanto al **índice de fatiga en 5 minutos**, tampoco encontramos diferencias significativas entre el grupo tratado con curcumina y los grupos I/R e I/R DMSO después de uno, tres y siete días de reperusión tras una isquemia de dos horas. Con estos hallazgos podemos concluir que la aplicación de curcumina en el músculo glucolítico que ha sufrido lesión por isquemia reperusión, no genera cambios significativos en la función muscular de la sacudida simple ni de la estimulación tetánica, así como tampoco en los índices de fatiga en 10 y 5 minutos.

En el caso del músculo soleo, encontramos que en la **sacudida simple**, el grupo tratado con curcumina (I/R DMSO CURC 1d) que tuvo un día de reperusión después de dos horas de isquemia, no tuvo diferencias significativas frente a los grupos I/R 1d e I/R DMSO 1d, frente a la fuerza máxima, tasa máxima de contracción, tasa máxima de relajación y tiempo de latencia.

En cuanto al grupo tratado con curcumina que tuvo tres días de recuperación tras dos horas de isquemia, encontramos, para la fuerza máxima, que aunque no tuvo diferencias significativas con los grupos I/R 3d e I/R DMSO 3d, tampoco las tuvo con el grupo control (con una alta desviación típica, como se ha expuesto antes). Resulta importante señalar aquí, que mientras en el músculo ERLC no existían diferencias significativas entre el grupo control y los grupos I/R 3d e I/R DMSO 3d (aunque con valores de p marginales), en el músculo soleo sí existen diferencias significativas entre el grupo control y los grupos I/R 3d e I/R DMSO 3d (con valores de p de 0,0 y 0,0 respectivamente), mientras que entre el grupo control y el grupo I/R DMSO CURC 3d no existen diferencias significativas (valor de p de 1,0). Aunque como se ha expuesto, el grupo I/R DMSO CURC 3d tuvo una alta desviación típica, consideramos que es factible que el grupo tratado con curcumina después de tres días de reperusión (que de

acuerdo con lo que observamos anteriormente correspondería al tiempo en que en el músculo soleo tiene una caída de la fuerza en la sacudida simple más pronunciada), muestre una recuperación frente a los grupos I/R 3d e I/R DMSO 3d, por el efecto antioxidante descrito previamente para la curcumina, precisamente en el músculo soleo, que por ser de naturaleza oxidativa y aunque está descrito que cuenta con mayores niveles de enzimas antioxidantes [23], dispone también de un mayor número de mitocondrias [23], que como se han descrito antes, son el recurso más importante en músculo esquelético para la producción de ROS. Adicionalmente, existe evidencia de que la curcumina tiene afinidad por proteínas descritas anteriormente como redox sensibles, que modificarían la fuerza muscular [28], entre ellas la NOS y la SERCA ATPasa [61], existiendo evidencia de que curcumina podría aumentar la expresión y actividad de SERCA ATPasa [62].

En cuanto a las otras variables de sacudida simple (tasa máxima de contracción, tasa máxima de relajación) así como tiempo de latencia, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con curcumina que tuvo tres días de recuperación tras isquemia de dos horas y los grupos I/R 3d e I/R DMSO 3d.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con curcumina que tuvo recuperación de siete días tras isquemia de 2 horas y los grupos I/R 7d e I/R DMSO 7d frente a la fuerza máxima, tasa máxima de contracción, tasa máxima de relajación y tiempo de latencia.

Respecto a la **estimulación tetánica**, encontramos que el grupo tratado con curcumina con un día de recuperación tras isquemia de dos horas, no tuvo diferencias con los grupos I/R 1d e I/R DMSO 1d frente a la fuerza máxima, tasa máxima de contracción y fatiga tras estimulación tetánica.

Después de tres días de recuperación tras isquemia de dos horas, el grupo tratado con curcumina, desarrolló una fuerza máxima significativamente mayor a la desarrollada por los grupos I/R 3d e I/R DMSO 3d. Cabe resaltar que a diferencia de lo encontrado para la fuerza máxima desarrollada en sacudida simple, el grupo I/R DMSO CURC 3d no presenta una alta desviación típica y por tanto se puede evidenciar de manera más directa, el posible efecto de la curcumina sobre la función del músculo oxidativo, precisamente en el tercer día de recuperación tras la isquemia.

También se evidencia, para la tasa máxima de contracción, que el grupo tratado con curcumina con tres días de recuperación tras la isquemia de dos horas, que hay un aumento significativo en ésta frente a los grupos I/R 3d e I/R DMSO 3d.

Dado que existe evidencia de que los altos niveles de ROS pueden alterar la estructura de los miofilamentos y disminuir su sensibilidad al calcio y que los ROS pueden alterar la cinética de los puentes cruzados y pueden potenciar la insensibilidad creciente al calcio de la fatiga muscular [28] y entendiendo también que la tasa máxima de contracción depende en parte de la velocidad de unión entre actina y miosina, podría considerarse que la acción antioxidante de curcumina es particularmente útil en este escenario.

Así mismo, encontramos que el grupo tratado con curcumina que tuvo recuperación de tres días tras dos horas de isquemia, alcanzó la fatiga tras la estimulación tetánica en un tiempo significativamente mayor al de los grupos I/R 3d e I/R DMSO 3d.

Después de siete días de recuperación tras isquemia de dos horas, el grupo tratado con curcumina no tuvo diferencias significativas con los grupos I/R 7d e I/R DMSO 7d frente a la fuerza máxima, tasa máxima de contracción y fatiga tras estimulación tetánica, con lo que se entiende que después de siete días de recuperación tras la

isquemia, la administración de curcumina no hace diferencia significativa con la administración de DMSO o con no dar terapia farmacológica.

En cuanto al **índice de fatiga en 10 minutos**, encontramos que en el grupo tratado con curcumina no hubo diferencias significativas frente a los grupos I/R e I/R DMSO después de uno, tres y siete días de reperusión tras una isquemia de dos horas.

Así mismo, en cuanto al **índice de fatiga en 5 minutos**, tampoco encontramos diferencias significativas entre el grupo tratado con curcumina y los grupos I/R e I/R DMSO después de uno, tres y siete días de reperusión tras una isquemia de dos horas.

8. Conclusión

Concluimos que la terapia farmacológica con curcumina en el músculo ERLC no afecta significativamente el desarrollo de fuerza en sacudida simple, en contracción tetánica, ni modifica los tiempos de fatiga. En el músculo soleo, concluimos que la curcumina aumenta significativamente la fuerza desarrollada tras la contracción tetánica, así como la tasa máxima de contracción y aumenta a su vez, la resistencia ante la fatiga tras la estimulación tetánica, después de tres días de recuperación tras isquemia de dos horas, frente a los grupos no tratados. Dada la alta desviación típica del grupo tratado con curcumina después de tres días de recuperación de una isquemia de dos horas, no fue posible constatar sus efectos positivos sobre la fuerza máxima tras la sacudida simple.

Perspectivas

Dentro de nuestro trabajo reportamos que la aplicación de curcumina en un modelo en ratas de isquemia reperusión de músculo esquelético, mostró diferencias significativas al tercer día en el músculo de predominio oxidativo respecto al desarrollo de fuerza tras la estimulación tetánica. Pese a que se han descrito ampliamente los blancos

farmacológicos de la curcumina, se requiere más investigación acerca del mecanismo de acción de curcumina sobre proteínas musculares redox sensibles en músculo esquelético, particularmente sobre aquellas que tienen mayor compromiso en el desarrollo de fuerza en el músculo oxidativo al regular las concentraciones intracitoplasmáticas de calcio, como también la medición de nivel peroxidación de lípidos en ambos músculo y la medición de actividad de enzimas antioxidantes. Así mismo, se hacen necesarias futuras investigaciones en isquemia reperusión en músculo esquelético con preparaciones de curcumina que aumenten su absorción y su vida media y que demuestren cual es el efecto de la administración periódica de curcumina sobre la respuesta funcional muscular.

9. Bibliografía

- [1] G. O. Puntel, N. R. Carvalho, F. Dobrachinski, A. C. F. Salgueiro, R. L. Puntel, V. Folmer, N. B. V Barbosa, L. F. F. Royes, J. B. T. Rocha, and F. a a Soares, "Cryotherapy reduces skeletal muscle damage after ischemia/reperfusion in rats," *J. Anat.*, vol. 222, no. 2, pp. 223–230, 2013.
- [2] I. I. Pipinos, A. R. Judge, J. T. Selsby, Z. Zhu, S. a Swanson, A. a Nella, and S. L. Dodd, "The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction.," *Vasc. Endovascular Surg.*, vol. 41, no. 6, pp. 481–489.
- [3] I. I. Pipinos, A. R. Judge, J. T. Selsby, Z. Zhu, S. a Swanson, A. a Nella, and S. L. Dodd, "The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: Part 2. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber type.," *Vasc. Endovascular Surg.*, vol. 42, no. 2, pp. 101–112.
- [4] R. García, S. Martínez, N. Hernández, A. Muñoz, G. Bretón, R. Garrido, and J. Gallo, "Incidencia y prevalencia de la enfermedad arterial obstructiva crónica (eaoc) de las extremidades inferiores." pp. 11–13, 2009.
- [5] A. Khanna, P. a Cowled, and R. a Fitridge, "Nitric oxide and skeletal muscle reperfusion injury: Current controversies (research review)," *J. Surg. Res.*, vol. 128, no. 1, pp. 98–107, 2005.
- [6] A J. Carvalho, N. H. McKee, and H. J. Green, "Metabolic and contractile responses of fast- and slow-twitch rat skeletal muscles to ischemia.," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 74, no. 12, pp. 1333–1341, 1996.
- [7] J. S. Jurenka, "Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research," *Altern. Med. Rev.*, vol. 14, no. 2, pp. 141–153, 2009.

- [8] R. K. Maheshwari, A. K. Singh, J. Gaddipati, and R. C. Srimal, "Multiple biological activities of curcumin: A short review," *Life Sci.*, vol. 78, no. 18, pp. 2081–2087, 2006.
- [9] J. Miquel, a. Bernd, J. M. Sempere, J. D??az-Alperi, and a. Ram??rez, "The curcuma antioxidants: Pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review," *Arch. Gerontol. Geriatr.*, vol. 34, no. 1, pp. 37–46, 2002.
- [10] G. Avci, H. Kadioglu, A. O. Sehirli, S. Bozkurt, O. Guclu, E. Arslan, and S. K. Muratli, "Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle," *J. Surg. Res.*, vol. 172, no. 1, pp. e39–e46, 2012.
- [11] E. Vazeille, L. Slimani, A. Claustre, H. Magne, R. Labas, D. Béchet, D. Taillandier, D. Dardevet, T. Astruc, D. Attaix, and L. Combaret, "Curcumin treatment prevents increased proteasome and apoptosome activities in rat skeletal muscle during reloading and improves subsequent recovery," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 23, no. 3, pp. 245–251, 2012.
- [12] D. L. Carden and D. N. Granger, "Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury," *J. Pathol.*, vol. 190, no. 3, pp. 255–266, 2000.
- [13] F. W. Blaisdell, "The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: A review," *Cardiovasc. Surg.*, vol. 10, no. 6, pp. 620–630, 2002.
- [14] E. M. Carmo-Araújo, M. Dal-Pai-Silva, V. Dal-Pai, R. Cecchini, and A. L. Anjos Ferreira, "Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: Morphological and histochemical studies," *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 88, no. 3, pp. 147–154, 2007.
- [15] A. Ma, S. Qi, and H. Chen, "Antioxidant Therapy for Prevention of Reperfusion Injuries and Allograft Rejection Inflammation , Ischemic," pp. 20–43, 2008.
- [16] P. Kvietys and D. Granger, "Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 52, no. 3, pp. 556–592, 2012.
- [17] T Kalogeris, CP. Baines, MKrenz,et al, "Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury". *Int Rev Cell Mol Biol* 298:229-317, 2012.
- [18] H. M. Piper, Y. Abdallah, and C. Schäfer, "The first minutes of reperfusion: A window of opportunity for cardioprotection," *Cardiovasc. Res.*, vol. 61, no. 3, pp. 365–371, 2004.
- [19] B. B. Rubin, P. M. Walker, D. C. Gute, J. Korthuis, B. Barry, P. M. Walker, C. Gute, and R. J. Korthuis, "Mechanisms intervention of postischemic strategies injury in skeletal muscle :"
- [20] S. Mense, "Algesic agents exciting muscle nociceptors," *Exp. Brain Res.*, vol. 196, no. 1, pp. 89–100, 2009.

- [21] M. J. Jackson, "Free radicals generated by contracting muscle: By-products of metabolism or key regulators of muscle function?," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 44, no. 2, pp. 132–141, 2008.
- [22] B. R. and L. M. P. 6th edition. M. (2009), "Berne R. and Levy M. Physiology. 6th edition. Mosby (2009)." 2009.
- [23] M. Picard, R. T. Hepple, and Y. Burelle, "Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function," *AJP Cell Physiol.*, vol. 302, no. 4, pp. C629–C641, 2012.
- [24] S. K. Powers, J. Duarte, A. N. Kavazis, and E. E. Talbert, "Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation.," *Exp. Physiol.*, vol. 95, no. 1, pp. 1–9, 2010.
- [25] S. K. Powers, A. N. Kavazis, and J. M. Mcclung, "Free Radical Biology in Skeletal Muscle Oxidative stress and disuse muscle atrophy," pp. 2389–2397, 2007.
- [26] E. Barbieri and P. Sestili, "Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling," *J. Signal Transduct.*, vol. 2012, p. 982794, 2011.
- [27] A. Espinosa, C. Henríquez-Olguín, and E. Jaimovich, "Reactive oxygen species and calcium signals in skeletal muscle: A crosstalk involved in both normal signaling and disease," *Cell Calcium*, 2016.
- [28] S. Powers and M. Jackson, "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production," *Physiol. Rev.*, vol. 88, no. 4, pp. 1243–1276, 2008.
- [29] C. Morales Jiménez and L. Fierro, "Tesis de Maestria 'Caracterización de las diferencias en la función contráctil en sacudida simple durante isquemia y reperusión entre músculos oxidativos y glicolíticos de ratas adultas'. Santiago de Cali: Universidad Del Valle." 2010.
- [30] M. D. Woitaske and R. J. McCarter, "Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle.," *Plastic and reconstructive surgery*, vol. 102, no. 6, pp. 2052–63, 1998.
- [31] T. J. Walters, J. F. Kragh, and D. G. Baer, "Influence of fiber-type composition on recovery from tourniquet-induced skeletal muscle ischemia-reperfusion injury.," *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, vol. 33, no. 2, pp. 272–281, 2008.
- [32] M. Reid, K. Haack, K. Franchek, P. Valberg, L. Kobzik, and M. West, "Reactive oxygen in skeletal muscle: Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro." 1992.
- [33] L. Zuo and T. L. Clanton, "Reactive oxygen species formation in the transition to hypoxia in skeletal muscle.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 289, no. 1, pp. C207–16, 2005.

- [34] N. Chainani-wu, "Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin ;," *J. Altern. Complement. Med.*, vol. 9, no. 1, pp. 161–168, 1999.
- [35] G. Gryniewicz and P. Ślifirski, "Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 59, no. 2, pp. 201–212, 2012.
- [36] S. Padhye, D. Chavan, S. Pandey, J. Deshpande, K. V. Swamy, and F. H. Sarkar, "Perspectives on chemopreventive and therapeutic potential of curcumin analogs in medicinal chemistry.," *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 10, no. 5, pp. 372–387, 2010.
- [37] A. Goel, A. B. Kunnumakkara, and B. B. Aggarwal, "Curcumin as 'Curecumin': From kitchen to clinic," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 75, no. 4, pp. 787–809, 2008.
- [38] S. Prasad, S. C. Gupta, A. K. Tyagi, and B. B. Aggarwal, "Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back," *Biotechnol. Adv.*, vol. 32, no. 6, pp. 1053–1064, 2014.
- [39] B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, and B. Sung, "Curcumin: An orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 169, no. 8, pp. 1672–1692, 2013.
- [40] S. C. Gupta, S. Patchva, and B. B. Aggarwal, "Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials," *AAPS J.*, vol. 15, no. 1, pp. 195–218, 2012.
- [41] R. Adibhatha and J. Hatcher, "NIH Public Access," *BMB Rep.*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [42] S. Shishodia, "Molecular mechanisms of curcumin action: Gene expression," *BioFactors*, vol. 39, no. 1, pp. 37–55, 2013.
- [43] A. R. Andrade-Silva, F. S. Ramalho, L. N. Z. Ramalho, M. Saavedra-Lopes, A. a Jordão, H. Vanucchi, C. E. Piccinato, and S. Zucoloto, "Effect of NFkappaB inhibition by CAPE on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury.," *J. Surg. Res.*, vol. 153, no. 2, pp. 254–62, 2009.
- [44] G. Avci, H. Kadioglu, A. O. Sehirli, S. Bozkurt, O. Guclu, E. Arslan, and S. K. Muratli, "Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle," *J. Surg. Res.*, vol. 172, no. 1, pp. e39–e46, 2012.
- [45] A. Shehzad, F. Wahid, and Y. S. Lee, "Curcumin in cancer chemoprevention: Molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials," *Arch. Pharm. (Weinheim)*, vol. 343, no. 9, pp. 489–499, 2010.
- [46] P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. a Newman, and B. B. Aggarwal, "reviews Bioavailability of Curcumin : Problems and Promises," vol. 4, no. 6, pp. 807–818, 2007.

- [47] P. Basnet and N. Skalko-Basnet, "Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment," *Molecules*, vol. 16, no. 6, pp. 4567–4598, 2011.
- [48] M. Metzler, E. Pfeiffer, S. I. Schulz, and J. S. Dempe, "Curcumin uptake and metabolism," *BioFactors*, vol. 39, no. 1, pp. 14–20, 2013.
- [49] M. J. Logan-Smith, P. J. Lockyer, J. M. East, and A. G. Lee, "Curcumin, a Molecule That Inhibits the Ca²⁺-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum but Increases the Rate of Accumulation of Ca²⁺," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 50, pp. 46905–46911, 2001.
- [50] C. Sumbilla, D. Lewis, T. Hammerschmidt, and G. Inesi, "The slippage of the Ca²⁺ pump and its control by anions and curcumin in skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 16, pp. 13900–13906, 2002.
- [51] G. J. Pinniger, M. Grzelak, B. Zhang, and a. J. Bakker, "T.P.10 The acute effects of curcumin exposure on skeletal muscle contractile function," *Neuromuscul. Disord.*, vol. 22, no. 9–10, p. 849, 2012.
- [52] W.-C. Huang, W.-C. Chiu, H.-L. Chuang, D.-W. Tang, Z.-M. Lee, L. Wei, F.-A. Chen, and C.-C. Huang, "Effect of curcumin supplementation on physiological fatigue and physical performance in mice.," *Nutrients*, vol. 7, no. 2, pp. 905–21, 2015.
- [53] T. Soukup, G. Zachařová, and V. Smerdu, "Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats," *Acta Histochem.*, vol. 104, no. 4, pp. 399–405, 2002.
- [54] M. Dal, P. A. I. Silva, and V. Dall, "Distribution of Different Fibre Types of M . extensor carpi radialis longus of the Rat," vol. 356, pp. 352–356, 1994.
- [55] R. Takagi, N. Fujita, T. Arakawa, S. Kawada, N. Ishii, and A. Miki, "Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 110, no. 2, pp. 382–8, 2011.
- [56] Y. L. Tsai, C. W. Hou, Y. H. Liao, C. Y. Chen, F. C. Lin, W. C. Lee, S. W. Chou, and C. H. Kuo, "Exercise training exacerbates tourniquet ischemia-induced decreases in GLUT4 expression and muscle atrophy in rats," *Life Sci.*, vol. 78, no. 25, pp. 2953–2959, 2006.
- [57] a Vignaud, J. Cebrian, I. Martelly, J.-P. Caruelle, and a Ferry, "Effect of anti-inflammatory and antioxidant drugs on the long-term repair of severely injured mouse skeletal muscle.," *Exp. Physiol.*, vol. 90, no. 4, pp. 487–495, 2005.
- [58] D. Thaloor, K. J. Miller, J. Gephart, P. O. Mitchell, and G. K. Pavlath, "Systemic administration of the NF-kappaB inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury.," *Am. J. Physiol.*, vol. 277, no. 2 Pt 1, pp. C320–C329, 1999.

- [59] E. González and O. Delbono, “Age-dependent fatigue in single intact fast- and slow fibers from mouse EDL and soleus skeletal muscles,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 122, no. 10, pp. 1019–1032, 2001.
- [60] M. Reid and M. Moody, “Dimethyl sulfoxide depresses skeletal muscle contractility.” pp. 2186–2190, 1994.
- [61] S. C. Gupta, S. Prasad, J. H. Kim, S. Patchva, L. J. Webb, I. K. Priyadarsini, and B. B. Aggarwal, “NIH Public Access,” *Nat.Prod.Rep*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [62] R. Manikandan, R. Thiagarajan, S. Beulaja, G. Sudhandiran, and M. Arumugam, “Curcumin prevents free radical-mediated cataractogenesis through modulations in lens calcium,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 48, no. 4, pp. 483–492, 2010.

10. Anexos

ANEXO 1: Carta de aval comité de ética animal Universidad ICESI

ANEXO 2: Cuadros estadística descriptiva variables de sacudida simple y contracción tetánica