

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**ESTUDIO MORFOMÉTRICO EN LA ULTRAESTRUCTURA DEL
MÚSCULO ESQUELÉTICO CON ESCLEROSIS SISTÉMICA
PROGRESIVA**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Radharani Caridad Dorta Ledezma**, como requisito parcial para optar por el título de **Licenciada en Biología**.

Tutor: Dr. Roschman González

Caracas – Venezuela
Mayo - 2017



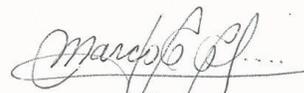
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

ACTA

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de la Escuela Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Bachiller Radharani Caridad Dorta Ledezma , C.I., V-20.841.579, titulado "Estudio morfométrico en la ultraestructura del músculo esquelético con Esclerosis Sistémica Progresiva", nos hemos reunido hoy, 16 de mayo de 2017, en la *Sala Werner-Jaffé* del Intituto de Biología Experimental (I.B.E) adscrito a la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para atender a la defensa pública de su trabajo, después de lo cual consideramos que amerita la calificación de DIEZ Y NUEVE (19) puntos. Certificamos así que este Trabajo Especial de Grado cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología.


Dra. Carolina Bernal

Jurado


Dr. Marco Álvarez

Jurado


Dr. Roschman Gonzalez

Tutor

RESUMEN

Los análisis morfométricos y estadísticos a partir de imágenes histológicas o ultraestructurales, presentan importantes ventajas sobre la evaluación visual convencional: aumentar la objetividad, reproducibilidad y la capacidad de detectar cambios no aparentes a simple vista. La morfometría es un medio que sirve al objetivo de correlacionar estructura-función y su justificación deriva del reconocimiento de que toda función regulada debe tener una base estructural organizada. En ese sentido, el siguiente trabajo pretende analizar las relaciones morfométricas que existen en alteraciones musculares esqueléticas en pacientes con Esclerosis Sistémica Progresiva. Para este fin se procesaron 7 biopsias del músculo *quadriceps femoris* por técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión (MET) a través de una doble fijación con glutaraldehído al 2,5% y tetróxido de osmio al 1% en buffer fosfato de Millonig, posteriormente una deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (50, 75, 90 y 100%). Por último, las muestras se incluyeron en epón y se cortaron con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Porter-Blum MT2-B, siendo estas secciones contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. El registro de las imágenes obtenidas por el microscopio electrónico Hitachi H-500 y el FEI Quanta 250 FEG modalidad STEM, fueron analizadas con un programa de morfometría (Image-Tool Ver.3.0). Entre el conjunto de alteraciones musculares esqueléticas estudiadas por MET, se describen lesiones tanto en la fibra muscular como en su microvasculatura asociada. Se observó plegamiento del sarcolema, edematización mitocondrial y desorganización del sistema contráctil (atrofia). Por otra parte, la microvasculatura exhibió deformaciones del endotelio vascular con oclusión del lumen y engrosamiento de la membrana basal. A partir de estas descripciones se seleccionaron las dimensiones de doce (12) parámetros celulares mesurables. Los resultados cuantitativos (morfométricos) de pacientes con ESP, fueron analizados con el STATISTICA ver.8.1 mediante una prueba de comparación de medias (T-Student, $p < 0.05$), mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto a los individuos con musculatura normal. A fin de esclarecer las interacciones de estas variables morfométricas en ambas condiciones, se realizó un análisis de correlaciones simples observándose una disminución de éstas en condición alterada respecto a la normal. No obstante, tales correlaciones fueron descritas mediante un análisis multivariado la cual discriminó ambas condiciones de estudio. Seguidamente, se evaluó mediante una Regresión Logística, el cambio significativo de cada variable medible en condición sano-enfermo. Como variables relevantes sobre esta condición, destacan: el porcentaje de atrofia, el diámetro mayor la mitocondria, el grosor de la línea Z y el área de la luz capilar. Estas variables se analizaron mediante una regresión lineal múltiple para describir la magnitud y número de interacciones que poseen con el resto de las variables morfométricas. Tales evaluaciones cuantitativas permiten la determinación de relaciones biológicas, tanto estructurales como funcionales, existentes entre los componentes fundamentales de la fibra muscular esquelética, lo cual contribuye a la comprensión de procesos biológicos de esta enfermedad que puedan mejorar su diagnóstico y tratamiento.

Palabras claves: Ultraestructura, Morfometría, Músculo Esquelético, Microscopía Electrónica

INTRODUCCIÓN

En estudios histológicos, el análisis cuantitativo de las imágenes microscópicas ha estado subordinado a la descripción cualitativa a causa de la necesidad de la observación humana para el reconocimiento de patrones en ellas (Baak y col., 1977). Sin embargo, ha habido un creciente interés por la evaluación cuantitativa de ellas debido a la subjetividad de las descripciones cualitativas y los cambios difícilmente reconocidos a simple vista (Weibel y Elias, 1967; Weibel, 1969).

Es así como la obtención de datos cuantitativos sobre la distribución espacial de los componentes morfológicos de tejidos y sus cambios, han aportado un gran avance para el entendimiento de la actividad funcional, el crecimiento y la enfermedad en el organismo (Chalkley, 1943). En ese sentido, la descripción cuantitativa, el análisis e interpretación de formas y sus variaciones en biología a través de estudios morfométricos, constituyen un área fundamental de investigación. Éstas podrían emplearse no sólo para comprender características biológicas, sino en prácticas de diagnóstico de rutina en algunas enfermedades importantes en las ciencias médicas (Rohlf, 1990; Kayser y col., 2012).

La morfometría es el análisis cuantitativo interactivo de células individuales o secciones de tejido por medio de una retícula ocular, un microscopio o una tableta gráfica (Baak, 1985; Marchevsky y col., 1987). Considerado interactivo, dado que la función esencial del

reconocimiento celular es llevada a cabo por un observador capacitado y es asistido por un instrumento computarizado que realiza las tareas de medición y procesamiento sobre la imagen de corte histológico o ultraestructural en estudio (Marchevsky y col., 1987). En resumen, los análisis morfométricos constituyen el estudio de las formas geométricas de organismos combinando su biología, geometría y estadística (Bookstein, 1986). Con ello es posible la obtención de información numérica sobre la estructura fina celular a fin de establecer una correlación cuantitativa de datos bioquímicos o fisiológicos con datos morfológicos obtenidos en células estructuralmente intactas (Weibel, 1969).

El objetivo de utilizar morfometría en biología reside principalmente en la necesidad de generar resultados objetivos y reproducibles a fin de aumentar la relación de lo observado con el tamaño de las partículas medidas. Para ello, es necesario que el investigador sea capaz de identificar el problema y seleccione cuidadosamente las variables (áreas, células y organelos subcelulares) relevantes para el estudio conservando un buen control de calidad en el proceso de medición. (Bookstein, 1986; Baak, 1987).

La aplicación de morfometría es posible a través de un conjunto de procedimientos que incluyen la utilización de estadística para analizar la variabilidad en el tamaño y forma de órganos u organismos (Stahl, 1962; Rohlf, 1990; Reyment, 2010). Es así como los avances en estudios en microscopía electrónica de transmisión (MET) se han convertido en parte esencial en estudios histológicos (Weibel, 1966), facilitando la observación y descripción

de tejidos y células demostrando que éstas se encuentran compuestas de un limitado y bien definido espectro de organelos (Weibel, 1969); esto permite el cálculo finito de formas y cantidades en la matriz intracelular. Simultáneamente la MET ha permitido crear un nexo entre la morfología y la bioquímica y lo macroscópico con lo ultraestructural en la que confluyen a nivel molecular, todas las partes de la biología: la morfología, la ultraestructura, la biofísica, la bioquímica y la fisiología (Mastaglia y col., 1982). Asimismo, el conocimiento de la ultraestructura celular y la química estructural de sus complejos biológicos constituyen los dos pilares fundamentales sobre los que se asienta actualmente la función celular (Mastaglia y col., 1982).

La microscopía electrónica por años se ha empleado para la descripción cualitativa de la ultraestructura de múltiples tejidos y componentes celulares con fines de una mejor comprensión del funcionamiento del mismo cuando éste se encuentra en presencia de una enfermedad o algún proceso biológico determinado. Asimismo, permite la comparación morfológica y estructural en ella o con otros tipos celulares logrando llegar a inferir acerca de la función diferencial que existen entre los grupos celulares que componen un mismo organismo (Hoare, 1964; James y Meek, 1979; Andrew & Agnes, 1980; Calivari y col., 1995; Dávila y col., 1997; Velasco y col, 2008). Esto sin duda alguna, abre un mundo de posibilidades para el estudio de diversas enfermedades desde un punto de vista estructural y funcional de la célula durante el proceso patológico.

Como modelo de estudio, la fibra muscular esquelética comprende un tejido estructuralmente bien definido sobre el cual pueden estudiarse de forma loable las alteraciones existentes en una amplia escala. Además constituye un grupo celular muy bien estudiado y descrito en biología celular.

Morfología y ultraestructura de músculo esquelético

El músculo esquelético se halla anclado en cada extremo por una resistente banda de tejido conectivo denominado tendón y está formado por haces musculares anatómicamente individualizables rodeados por una cubierta conjuntiva denominada epimisio (Figura 1). Cada haz está conformado por fascículos dispuestos paralelamente y recubiertos por el perimisio; en su interior a su vez, se encuentran las fibras musculares con su propio

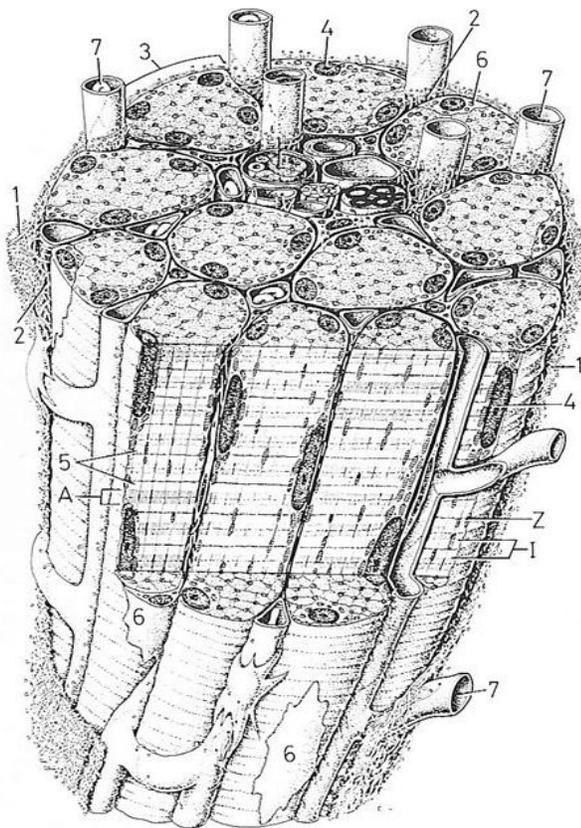


Figura 1. Una representación de un fascículo pequeño de miofibrillas (1) rodeado externamente por el perimisio. Seguido por el endomisio (2) entre las miofibrillas individuales (3). Éstas contienen núcleos alargados (4), sarcómeros (5) y miosatélites pequeños (6) que se adhieren estrechamente a su superficie externa. También se muestran numerosos capilares que se extienden longitudinalmente (7).
Extraído de la figura 1.1. *Landon D. skeletal muscle – normal morphology, development and innervation.* p2.

recubrimiento llamado endomisio (Barbany, 2002; Cuenca, 2006) (Figura 2).

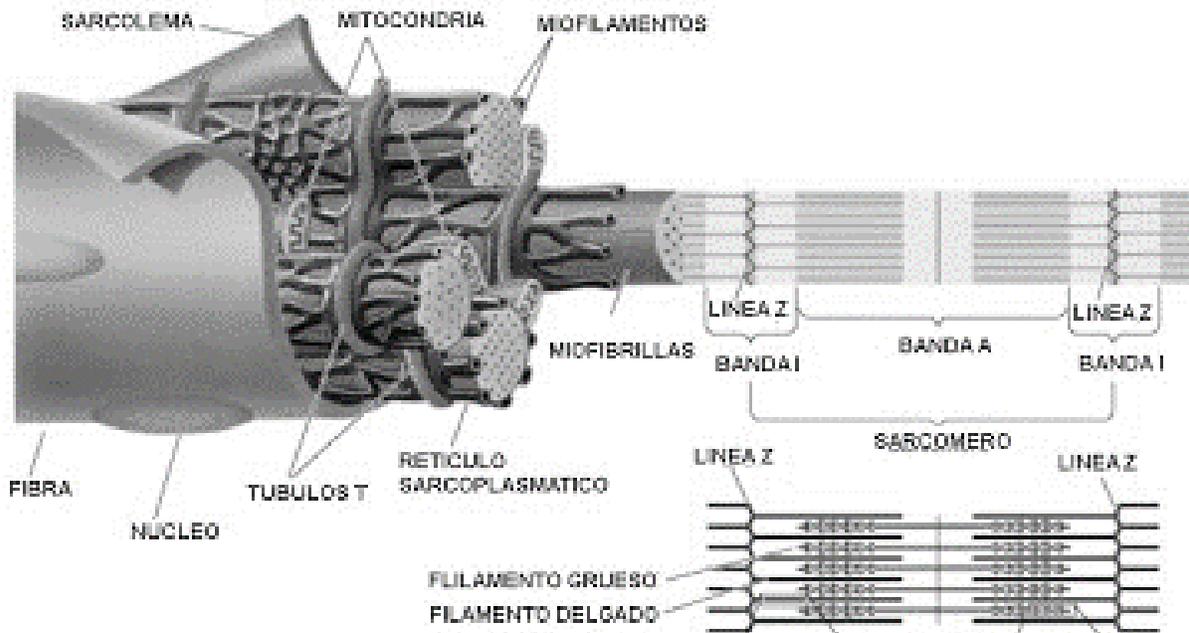


Figura 2. El músculo está constituido por fibras multinucleadas paralelas, cada una de las cuales contiene muchas miofibrillas. Éstas están formadas por sarcómeros ordenados de un extremo a otro. Extraído de: <http://biohumana35.blogspot.com/2011/06/sistema-muscular-celula-muscular-y.html>

Cada músculo está constituido especialmente por largas células cilíndricas y multinucleadas organizadas paralelas unas con respecto a las otras, conocidas como **fibras musculares** (Schmalbruch, 1985) (Figura 2). Éstas son la unidad estructural y funcional del tejido musculoesquelético, poseen una longitud muy variable de hasta 10cm o más y con diámetro de 10-100µm aproximadamente (Landon D., 1982; Lieber, 2002). El diámetro de la fibra muscular es importante porque determina su fuerza y cuando existe alguna alteración en

una fibra madura, podría sugerir que el nivel de músculo en uso ha cambiado (Lieber, 2002) pudiendo ser un indicador determinante en la calidad de vida del individuo.

Sus múltiples núcleos situados en la periferia, se encuentran contiguos internamente a la membrana plasmática (sarcolema) y el citoplasma (sarcoplasma) es muy abundante y se halla cruzado por un retículo sarcoplasmático altamente desarrollado (Barbany, 2002) (Figura 3).

La capa más superficial de la fibra, el sarcolema, es la estructura doble formada por la **membrana plasmática** y la **membrana basal** (Figura 3). La primera constituye la envoltura lisa eléctricamente excitable compuesta de una bicapa lipídica y una variedad estructural de receptores y proteínas metabólicamente activas, además proporciona una cobertura para el sincitio del sarcoplasma y sus miofibrillas (Landon, 1982).

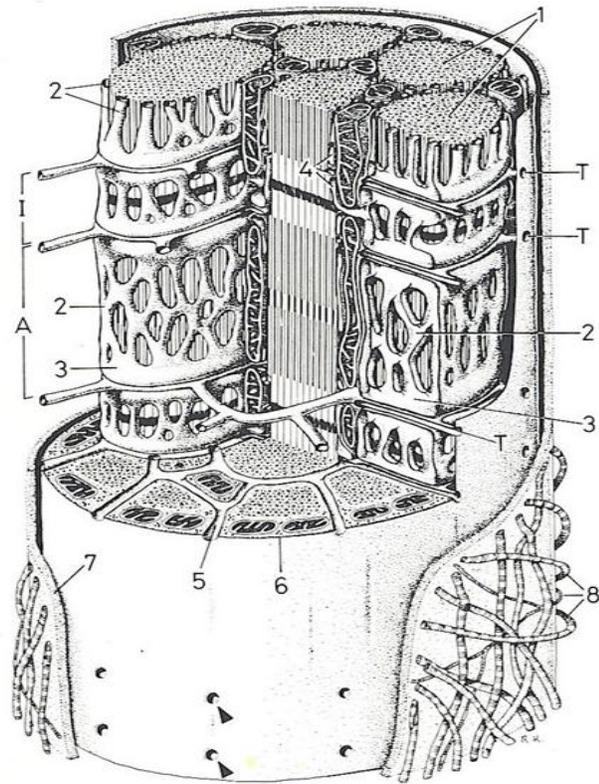


Figura 3. Una sección diagramática de una miofibrilla. Las miofibrillas (1), con su entramado de filamentos gruesos y finos y sus bandas A e I. Son envueltos por sacos complejos de retículo sarcoplasmático, estos se dividen en dos zonas centrales desnaturalizadas (2) y cisternas terminales (3). El sistema tubular transverso (T) entra en contacto con las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático en las tríadas (4) alrededor de cada miofibrilla, su superficie es continua (5) con la membrana plasmática (6). La fibra está rodeada externamente por un componente extracelular amorfo, la lámina basal (7), que con las fibras de colágeno endomisial (8), constituyen en conjunto el sarcolema. Extraído de. Landon D. *skeletal muscle – normal morphology, development and innervation*. Figura 1.4, pág. 10.

La **membrana basal** (Figura 3) que está compuesta por dos capas de diferente electrondensidad: la lámina lúcida y la lámina externa (densa), contienen variedad de proteínas, pero principalmente de lamininas y colágeno tipo IV (Landon 1982; Cuenca, 2006). Posee un espesor de 20-30nm aproximadamente y se encuentra adherida al contorno externo de la célula muscular. Aunque su función no es clara, se conoce que además de ser un soporte mecánico, tiene una función organizativa e influye en procesos de señalización celular importantes para la diferenciación y función de células adyacentes. (Landon, 1982; Dubowitz, 1985; Sanes, 2003).

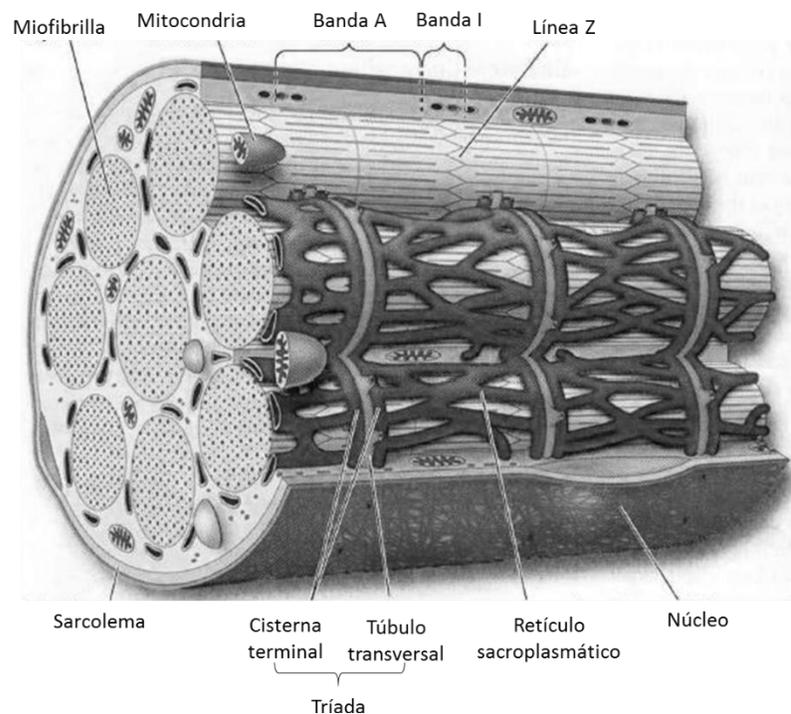


Figura 4. Representación esquemática de la célula muscular. Note la formación de “triadas”, también note que se observa la apariencia estriada típica. Sarcoplasma ocupado por mitocondrias y retículo sarcoplasmático alrededor de cada miofibrilla. Extraído y modificado de: Brooks y col.

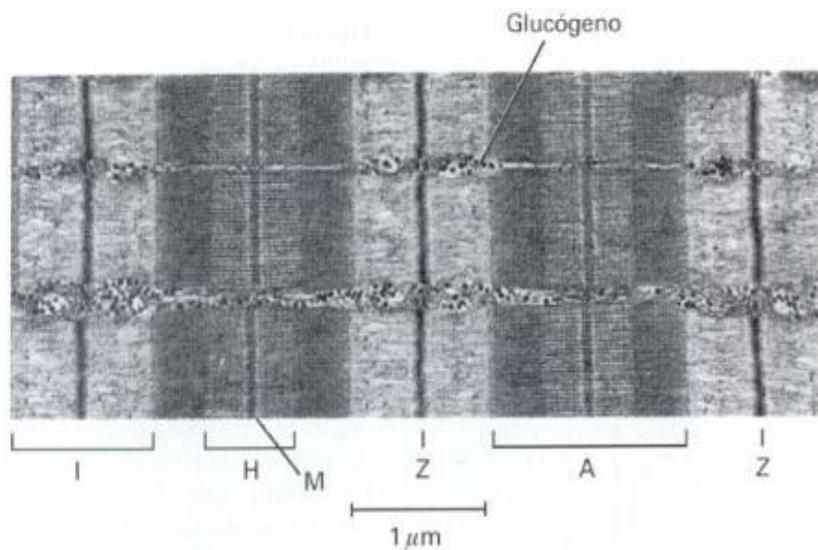
En el interior de la célula se encuentran dos sistemas internos de membranas muy bien definidos y separados (Figura 4):

- Sistema transversal (Sistema T): son extensiones e invaginaciones de la membrana plasmática hacia el interior de la fibra, a la que atraviesan, pero no se abren en su interior (Dubowitz, 1985; Cuenca, 2006;). En humanos, este sistema rodea a las miofibrillas al nivel de la intercepción de las bandas I con las bandas A (Lazarides, 1980; Tokuyasu y col, 1983).
- Retículo sarcoplasmático: es una vaina o cubierta que corre y circunda alrededor de cada miofibrilla y es perpendicular al sistema T (Figura 4). Esta posee unos ensanchamientos en forma de sacos laterales en la proximidad de las invaginaciones del sistema T denominadas cisternas terminales. Las **tríadas** están formadas por dos de estas cisternas terminales y un segmento de túbulo T con el que hacen contacto; en mamíferos se describen dos tríadas por sarcómero a nivel de la unión de las bandas A e I. Este retículo está especializado en la captación, almacenamiento y liberación de iones de calcio; regulando la cantidad del mismo disuelto en el interior celular (Dubowitz, 1985; Cuenca, 2006).

No obstante, gran parte del volumen celular de la fibra muscular está ocupado por elementos contráctiles llamados **miofibrillas**, dispuestas paralelamente a lo largo de la célula en el sarcoplasma. Éstas contienen **mitocondrias** localizadas regularmente cerca del sistema contráctil y son fundamentales para el suministro de energía en forma de ATP

necesaria para la contracción (Randall y col., 1997). Por lo general, ellas tienden a ubicarse en la región interna del sarcolema (espacio **subsarcolémico**) y entre las miofibrillas del sistema contráctil (**espacios intermiofibrilares**).

Estas miofibrillas consisten en una serie de elementos repetidos longitudinalmente llamados **sarcómeros**, que son la unidad funcional de la fibra muscular esquelética y se extienden en ambas direcciones desde la **línea Z** (Figura 5). La alternancia regular de diferentes proteínas dentro de ellos, da lugar al patrón estriado característico del mismo con numerosos filamentos delgados constituidos principalmente de actina e intercalados con filamentos gruesos de miosina.



Cada sarcómero está compuesto por una banda anisotrópica

Figura 5. Micrografía electrónica de una sección longitudinal de músculo esquelético. Los sarcómeros de las diferentes miofibrillas están alineados en formación produciendo las bandas características del músculo esquelético. Extraída y modificada de: Randall, y col. *Fisiología animal – mecanismos y adaptaciones*. Figura 10-2; pág. 383.

oscura (banda A) conformada en su parte más densa por filamentos gruesos y delgados intercalados; está flanqueada a ambos lados por una banda isotrópica (banda I). La región central de la banda A está atravesada por una línea estrecha y densa (línea M), y está unida a ambos lados por la zona H ligeramente más pálida, ésta solo contiene filamentos gruesos (Figura 5). Los filamentos de la banda I están unidos en su punto medio a la estrecha y **densa línea Z** (disco Z) que marca el límite longitudinal de cada sarcómero (Figura 5).

En reposo, cada sarcómero mide 2,5 a 3 μ m de longitud. Por otra parte, la contracción ocurre por acortamiento de los sarcómeros. Se logra con los filamentos de actina (banda I) deslizándose hacia el centro de la banda A. Durante este proceso, la banda I y la zona H se acortan pero la banda A permanece una longitud constante de 1,5-1,6 μ m. (Huxley, 1969; Squire y col., 1982; Dubowitz, 1985; Randall y col., 2002; Lieber, 2002).

Algunas estructuras asociadas a tejido muscular esquelético de suma importancia, son los **capilares**, frecuentemente vistos en secciones ultradelgadas de este tejido (Figura 6). Las arterias viajan a lo largo del eje del músculo y dan lugar pequeñas ramas (arteriolas) que corren en septos entre fascículos y se dividen, ramifican y

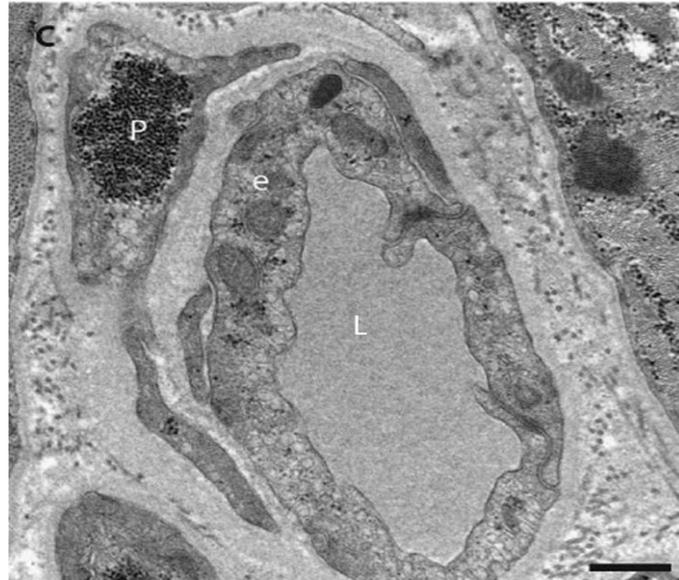


Figura 6. Sección transversal de capilar con célula endotelial regular (e) y lumen normal (L). Pericito (P) con abundante glucógeno. Barra= 500nm. Extraído y modificado de: Buckley y Bossen. 2013. Figura 1C.

penetran en éstos formando las redes capilares interconectadas que rodean a las fibras musculares individuales (Goebel y col., 1991; Buckley y Bossen, 2013).

Los capilares normales tienen **lúmenes** (luz capilar) de 5 a 10 μm de diámetro y están revestidos por células endoteliales con perfiles planos (Figura 6). Este sistema de vasos tiene como función principal el intercambio de fluidos y proteínas. Estos constan de poros en las membranas proporcionando una vía de transporte para el oxígeno, dióxido de carbono y moléculas muy pequeñas solubles en agua pero, la mayoría del flujo transvascular se produce a través de las uniones estrechas de las células endoteliales (Buckley y Bossen, 2013).

Las **células endoteliales**, contienen numerosas **vesículas pinocíticas** (Figura 7) que constituyen uno de los mecanismos de transporte de mayor importancia dentro del sistema vascular (Moore y Ruska, 1957; Dubowitz, 1985; Buckley y Bossen, 2013). El grado de actividad pinocítica en los endotelios parece depender de las necesidades de las células circundantes y las manifestaciones de esta actividad varían en los capilares que suministran diferentes tejidos (Moore y Ruska, 1957).

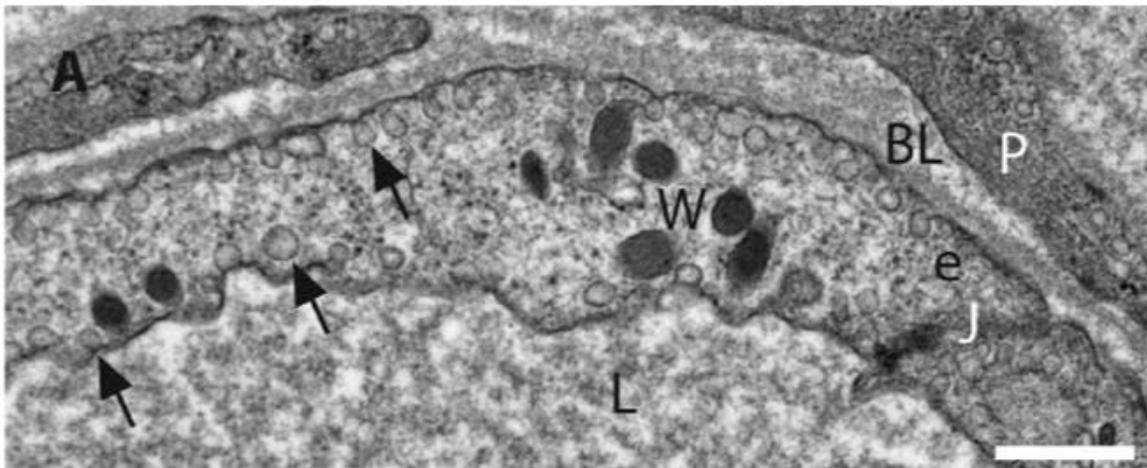


Figura 7. Micrografía electrónica de sección transversal de capilar, en él se observa la pared capilar, el lumen (L) y múltiples vesículas pinocíticas (flechas) en la célula endotelial (e), se identifica una unión estrecha entre ellas (J) y cuerpos Weibel y Palade (W). Se encuentran otras estructuras como el pericito (P) rodeado de la membrana basal (BL). Barra=500nm. Extraído y modificado de: Buckley y Bossen. 2013. Figura 2A.

Los **pericitos**, sin embargo, se encuentran generalmente adosados a la superficie externa de las células endoteliales, y son células de origen mesodérmico presentes en todo tipo de vasos (Dubowitz, 1985). Tienen una diversidad de funciones implicadas en la angiogénesis, en procesos fagocíticos y de microcontractilidad vascular (Buckley y Bosen, 2013).

Asimismo, la **membrana basal del capilar**, es una matriz extracelular que recubre la capa más externa y encierra todos los elementos que constituyen la pared capilar como las células endoteliales y el pericito (Dubowitz, 1985; Goebel y col., 1991). Tal como en la fibra muscular, sirve de soporte mecánico y está involucrado en procesos de señalización celular; además parecen ser necesarias en la aparición de tejidos y diferenciación de algunas células (Buckley y Bossen, 2013). En su mayoría, las membranas basales tienen un espesor de 50-100nm aproximadamente y algunas de sus funciones están relacionadas con procesos de homeostasis tisular, desarrollo embrionario y tienen importancia en múltiples enfermedades humanas. Por esta razón, la membrana basal capilar ha sido ampliamente estudiada dada la frecuencia de alteraciones que éstas estructuras exhiben en diferentes enfermedades (Miner y Yurchenco, 2004; Hohenester y Yurchenco, 2013).

Además del capilar, muchas de las estructuras que componen a la fibra muscular esquelética pueden verse afectadas durante un proceso patológico. Tales afecciones pueden ser observadas y descritas mediante un estudio histológico o por microscopía electrónica de transmisión, sobre el cual se detallan las múltiples lesiones presentes en ella durante la enfermedad. Dicho esto, en presencia de enfermedades como las miopatías inflamatorias en el cual el proceso patológico primario es la afectación del músculo esquelético, se describen alteraciones ultraestructurales que pueden ser caracterizadas mediante la aplicación de morfometría contribuyendo al aporte de referencias numéricas del grado de alteración o afectación de las estructuras antes mencionadas en pacientes con Esclerosis.

Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP) como modelo de estudio en aplicación de morfometría para la determinación de alteraciones ultraestructurales descritas y estudiadas por MET

La Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP) pertenece a un grupo heterogéneo de enfermedades diversas en etiopatogenia y manifestaciones clínicas conocidas como miopatías inflamatorias (Mastaglia y col, 1996; Dalakas, 2015); éstas se caracterizan por presentar inflamación del músculo y su principal consecuencia clínica reside en la debilidad muscular que varía de moderada a severa y con menos frecuencia, presentan dolor (Hilton-Jones, 2003; O'callagan y Trallero, 2008; Dalakas, 2011).

La ESP es una enfermedad caracterizada por la deposición excesiva de colágeno, hiperreactividad vascular y oclusión de la luz microvascular (Ranque, y col. 2008; Asokan y col., 2013); entendiéndose hiperreactividad vascular como los cambios en la presión sanguínea, frecuencia cardíaca u otros parámetros hemodinámicos en respuesta a un estímulo físico (Amador S., y col. 2015). La disfunción vascular y sus alteraciones, conducen a fenómenos de isquemia y fibrosis de diversos tejidos u órganos: vasos sanguíneos, piel, articulaciones y músculo, incluyendo tubo digestivo, pulmón, corazón y riñón entre los órganos más afectados (Prescott y col. 1992; Derk y Jiménez, 2003; Jiménez y Mendoza, 2015; Hassan y col., 2015).

El origen de esta enfermedad es desconocida, pero cada vez se dispone de más conocimientos acerca de los mecanismos patogénicos que conducen a las diferentes variaciones características de ella como: las anormalidades inmunológicas, vasculares y de tejido conectivo (componente fibrótico) (Silver, 1991); siendo entre ellas, la afectación vascular la que se expresa con mayor evidencia (Black, 1993). En las irregularidades inmunológicas, se encuentran implicadas tanto la inmunidad celular como la humoral, definiéndose como una enfermedad autoinmune (Derk y Jiménez, 2003) y está caracterizada por un curso clínico heterogéneo con diferentes grados de afectación de la piel y resto de órganos. Su pronóstico depende del compromiso visceral, en especial, del daño renal, pulmonar y cardíaco (Alegre y col. 2008; Anbiase y Tafakhori, 2011). No obstante, la afectación musculoesquelética es una de las manifestaciones más frecuentes en pacientes con esclerosis (Medsger y col. 1968), y es una de las que debe evaluarse cuidadosamente durante la examinación ya que influyen sustancialmente en la calidad de vida del paciente; su importancia radica en el valor predictivo que poseen algunas de estas manifestaciones sobre la actividad y gravedad de la enfermedad (Lóránd y col. 2014).

Conjuntamente, la agrupación familiar de la enfermedad, la alta frecuencia de trastornos autoinmunes en familias con pacientes con esclerodermia y las diferencias en los fenotipos entre grupos étnicos y razas, sugiere que los factores genéticos también contribuyen de forma importante en la aparición de la ESP; es decir, existe una correlación con los fenotipos clínicos e incluso, la aparición de ciertos autoanticuerpos (Gabrielli y col., 2003; Alegre y col. 2008). En ese sentido, se han considerado un cierto número de agentes

promotores del desarrollo de la enfermedad, como la intervención de factores genéticos (Mayes, 2005; Agarwal y col., 2008; Batista y col. 2014) asociando su existencia con cuatro grandes autoanticuerpos específicos que son utilizados como marcadores diagnósticos: anti-centrómero, anti-Th/To, anti-topoisomerasa I y anti-ARN polimerasa III (Koenig y col., 2008).

A pesar que no existe ninguna hipótesis unificada que explique su patogenia, se conocen las anormalidades fundamentales en tres tipos de células que están estrechamente relacionadas al desarrollo de las manifestaciones clínicas típicas de la enfermedad; estos tipos celulares son los fibroblastos, células endoteliales y células del sistema inmunológico (Principalmente linfocitos T y B). Las alteraciones funcionales en estas células, ocasionan la tríada característica de afecciones particulares de la enfermedad: importante fibrosis cutánea y visceral, oclusión de la luz de pequeñas arterias y arteriolas y anormalidades en la inmunidad humoral y celular (Batista y col. 2014). Estas últimas consideradas las promotoras de la producción de múltiples anticuerpos, la infiltración de células mononucleares en algunos tejidos y la alteración en la producción de linfocinas y factores de crecimiento (Roumm y col., 1984; Jiménez y Derk, 2004).

Sin embargo, el desconocer la etiología y mecanismo de daño de esta enfermedad, permite formular una posible hipótesis unificadora acerca de la patogenia de la enfermedad. James R. Seibold establece que su patogenia debe considerar y explicar los siguientes hechos: 1) Notable heterogeneidad de los patrones de la progresión de la enfermedad y de la

afectación de los órganos internos; 2) Tasa acelerada de acumulación de matriz extracelular, tanto en la piel como en los órganos internos; 3) Anomalías inmunológicas, frecuentes y características; 4) Contribuciones variables de los cambios inflamatorios agudos y crónicos, 5) Anomalías características de la función y estructura de los vasos (Harris y col. 2006).

La Esclerosis desde sus inicios puede presentar múltiples manifestaciones con curso heterogéneo, por tanto, son muchas las que se presentan en el transcurso de la enfermedad entre las cuales, la afección vascular es predominante e inicia como una anomalía funcional (vasoconstricción) de forma simultánea a las alteraciones arteriolas, exhibiendo modificaciones estructurales en la microvasculatura (Jayson, 1983; Bollinger y col., 1986;). Estas constituyen una de las manifestaciones con mayor importancia dada su relación y participación en la afectación de diversos órganos internos (Maricq y col., 1976).

En cuanto a las manifestaciones cutáneas, la *esclerodermia* es la más característica y la que mayor repercusión tiene sobre la calidad de vida del paciente y su percepción de la enfermedad (Figura 8). Ésta pasa por múltiples etapas correspondientes a los hallazgos histológicos estudiados: una fase inicial edematosa, debida a inflamación perivascular, seguida de una fase indurativa o esclerótica consecuencia del depósito de colágeno y matriz extracelular con fibrosis de la dermis y finalmente, la piel evoluciona a una fase de atrofia, con adelgazamiento de la misma (Prescott, y col. 1992). Estos mismos cambios histopatológicos (lesión endotelial y fibrosis) son comunes en su evolución y curso a la

afectación de otros órganos y tejidos (Derk, 2003). De ahí la correlación existente entre el grado de afectación cutánea, el riesgo de alteración de los órganos internos y el pronóstico de la enfermedad (Alegre y col. 2008).



Figura 8. Lesiones avanzadas de esclerodermia en la mano de una mujer con enfermedad de larga evolución. La piel está tensa y engrosada, con alteración pigmentaria irregular. Existen ulceraciones sobre las prominencias óseas, y los dedos exhiben anomalías tróficas extensas. Extraída de Kelly Tratado de Reumatología. Seibold J.R. 2006.

De forma simultánea, entre las manifestaciones sistémicas que constituyen las de mayor cuidado, destacan las de tipo digestivo que surgen como consecuencia final de la afectación vascular, conduciendo a fibrosis y daño del tracto digestivo, siendo éste

uno de los órganos internos más comprometidos. En él se describe disfunción esofágica, con hipomotilidad (motilidad del tracto disminuida) y mala absorción por crecimiento bacteriano (Alegre y col. 2008; Karassa y Ioannidis; 2008). Las manifestaciones pulmonares, que son determinantes de la mortalidad de pacientes con ESP, exhiben igualmente fibrosis e hipertensión pulmonar, también como consecuencia del desarrollo de daños vasculares e inflamación. Además, las manifestaciones cardíacas pueden aparecer como causa primaria a consecuencia de la evolución de la afectación vascular ocasionando trastornos de contractilidad y conducción (Roberts y Cabeen, 1980; Karassa y Ioannidis; 2008), o también aparecer de forma secundaria como en caso de una miocardiopatía hipertensiva o a causa de una hipertensión pulmonar. Ésta es considerada la lesión visceral

más severa y determina la supervivencia del paciente. Otra de las manifestaciones que genera una de las mayores complicaciones en pacientes con ESP, es la considerada Crisis Renal de Esclerodermia (CRE). El daño al riñón se caracteriza por hipertensión maligna y conlleva a insuficiencia renal aguda (oliguria); sin embargo la ocurrencia de esta afectación es más común en pacientes tratados con glucocorticoides que aumenta el riesgo de padecer este síndrome al incrementar la dosis del mismo (Mouthon, 2009).

Finalmente, las manifestaciones **musculoesqueléticas**, son a menudo las más angustiantes de la esclerodermia y un factor que contribuye a la discapacidad en los pacientes. Los síntomas clínicos más frecuentes son dolor y debilidad muscular; la frecuencia del dolor varía entre el 20 y 86% en los pacientes con Esclerosis. Por otra parte, la baja prevalencia de debilidad muscular en la mayoría de los estudios sugiere que la participación muscular de los pacientes con la enfermedad es bastante moderada o que el nivel de actividad física se reduce debido a otras causas como: malestar, sinovitis (inflamación de membranas sinoviales de las articulaciones) o enfermedades del corazón y pulmón.

Algunas veces la debilidad muscular puede no ser a causa de una miopatía primaria, sino como consecuencia de otros síntomas asociados a la esclerodermia, como la afectación de las articulaciones, contracturas de la piel o fatiga (Lóránd y col., 2014).



Figura 9. Paciente con Esclerosis Sistémica. Afecciones musculares y articulares. Extraído de <https://naturalcureproducts.wordpress.com/tag/scleroderma-symptoms/>

Aunque clínicamente no es común la apreciación de la inflamación articular, la pérdida de la función de las manos ocurre a medida que empeora el engrosamiento de la piel, generando como consecuencia la fijación y pérdida de movilidad en algunas

articulaciones (Seibold, 2009) (Figura 9). Asimismo, el cambio comúnmente observado, es a nivel intersticial en presencia de fibrosis perivascular, seguido en frecuencia por infiltrados inflamatorios con atrofia y necrosis de las fibras (Medsger, 1968). Tal como se describen en algunos hallazgos histológicos, está presente la fibrosis intersticial en el perimisio y epimisio, atrofia, miofibrillas necrosadas y regeneración en diferentes grados (Gabielli y col., 2009; Lóránd y col., 2014).

Alteraciones ultraestructurales descritas por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) en fibras musculares esqueléticas y capilares asociados en pacientes con Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP)

Entre las manifestaciones descritas en la Esclerosis Sistémica, las alteraciones musculoesqueléticas e incluso la pérdida progresiva de las funciones viscerales y cutáneas,

constituyen el grupo de alteraciones más evidentes presentes en la mayoría de los pacientes (Jayson, 1983; Bollinger y col. 1986; Derk, 2003; Ranque, y col. 2008; Seibold, 2009). No obstante, a nivel microscópico se pueden establecer diferencias con otras miopatías en el que la inflamación y degeneración de tejidos, son causa obvia e inmediata de la enfermedad clínica (Winkelmann, 1971). Algunos hallazgos como altos niveles de enzimas musculares en plasma, estudios electromiográficos y de biopsias musculares permiten la distinción de los diferentes trastornos que pueden tener importancia en el estudio y diagnóstico de esta enfermedad (Clements, 1978; Ranque y col., 2008).

La observación de biopsias musculares por MET revela múltiples alteraciones ultraestructurales como la degeneración y atrofia en diferentes grados de la fibra muscular, acompañados de fibrosis y en presencia de infiltrados (células mononucleares) a nivel intersticial (Medsger, 1968; Finol y col., 1994). En cuanto a su degeneración, se describen un amplio espectro de anormalidades que conllevan incluso a necrosis y daños eosinofílicos (Clements, 1978).

En los casos de atrofia extrema, hay poco reconocimiento de elementos miofibrilares y pérdida completa de la organización sarcomérica característica de músculo esquelético. No obstante, de forma importante, se describen anormalidades microvasculares como: la atrofia de células endoteliales y distorsión del lumen capilar, seguidas algunas veces, del engrosamiento y reduplicación de la membrana basal. A nivel histológico, enfatizan en el estrechamiento y oclusión de la luz vascular, típica en estas anormalidades (Bollinger,

1987; Finol y col. 1994), siendo indicadores especiales de la función del mismo. Sumado a estas descripciones, los pericitos y fibroblastos también presentan alteraciones, en algunos casos, engrosamiento del retículo endoplasmático en presencia de una fibrosis alrededor de los vasos capilares (Hembold y col., 2004).

Sin embargo, muchos de estos cambios descritos anteriormente, son compatibles con alteraciones observadas en fibras musculares de algunas otras enfermedades autoinmunes como: Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Diabetes Autoinmune, Síndrome de Sjörgen. (Finol y col., 1990; Ibarra y col., 2007). En ese sentido, estas alteraciones descritas cualitativamente pueden ser estudiadas a través de métodos cuantitativos que permitan, de forma objetiva, determinar patrones y establecer posibles diferencias entre las patologías del grupo anteriormente mencionado, de modo que puedan emplearse métodos métricos con fines prácticos y objetivos en el estudio de esta enfermedad.

ANTECEDENTES

La mayor parte de la literatura está basada en el estudio de la etiopatogenia, clasificación y diagnóstico de la enfermedad debido a la relación directa que tiene con la calidad de vida del paciente y su posible tratamiento. No obstante, un grupo de investigaciones han tratado de abordar los aspectos descriptivos acerca de las alteraciones y manifestaciones de algunas patologías por medio de métodos cuantitativos. Gran parte de estos estudios fueron realizados en la década de los 80, año en los que se inicia el auge de la aplicación de métodos morfométricos y estereológicos en el área de biología (Jerusalem F. y col., 1974; Sjöstrom y col., 1982; Hamilton y Allen, 1995). Sin embargo, éstos fueron diferidos hasta la actualidad, dado que, con el desarrollo de la tecnología y sistemas computacionales, se ha hecho posible la continuación y aplicación de estas técnicas con mayor exhaustividad y eficiencia en diferentes áreas como en la zoología, oncología, y en patología ultraestructural de múltiples enfermedades (Bohringer y Hecker, 1974; Stevens y Godfrey, 1991; Caliarì y col., 1995; Tejero y col., 2008; Duran y col., 2010).

Tal como sugieren Hamilton P. y Allen D. (1995), en su trabajo titulado “*Morphometry in histopathology*”, considera que la toma de medidas presenta importantes ventajas sobre la evaluación visual convencional, como: objetividad, reproducibilidad y la capacidad de detectar cambios no aparentes a simple vista. El objetivo del trabajo reside en la existencia de múltiples técnicas cuantitativas disponibles para mediciones histológicas que pueden ser relevantes en procesos diagnósticos. Pero tales aplicaciones morfométricas requieren una

estandarización del método en función del tejido o muestra y el propósito diagnóstico, un amplio número de casos evaluados, disponibilidad de tiempo y comprensión del método morfométrico empleado; de modo que la evaluación cuantitativa ayuda a mejorar la interpretación de cambios morfológicos.

Así como Hamilton y Allen, Baak (1987) presenta una visión general de las diferentes técnicas que se utilizan en estudios patológicos cuantitativos en su estudio “*Quantitative pathology today: a technical view**”, haciendo un enfoque especial en técnicas de: morfometría, citometría estática, citometría de flujo, y análisis de imágenes digitales. Esto con el fin de generar en un futuro no muy lejano, softwares y sistemas operativos que realicen la tarea que normalmente requiere la inteligencia humana como ayuda para el diagnóstico. Ésta podría consistir en la generación de un criterio de decisión (cuantificado), un archivo de criterios o imágenes vinculadas con la ocurrencia de ciertos cambios histológicos y características celulares producto de la enfermedad. En ese sentido, muchas de las razones para aplicar morfometría en patologías anatómicas, residen en la disminución de la variabilidad cuantificando características celulares y tisulares que se obtienen por observación, proveer escalas cuantitativas del grado de alteración de las estructuras, incrementar la sensibilidad en la identificación de cambios mínimos en las características y cuantificar el efecto de cambios en un método de procesamiento de tejidos entre las de mayor importancia sugeridos por True L. (1996) en su trabajo “*Morphometric applications in anatomic pathology*”.

Igualmente, en su trabajo “*Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology*” (1969), Weibel establece que los cambios en la función celular generalmente se asocian con un aumento o reducción de organelos en lugar de alteraciones cualitativas inequívocas. Esto es particularmente cierto si los cambios ocurren dentro del rango fisiológico. Por tanto, la morfometría no es más que un medio que sirve al objetivo de correlacionar estructura-función y su justificación deriva del reconocimiento de que toda función regulada debe tener una base estructural organizada de un tamaño adecuado pero no excesivo. Sin embargo, como todo modelo biológico, tiene su propia variabilidad, por ende, para su estudio se debe preservar la relación entre sus estructuras, para ello, es necesario la preservación del tejido y la posterior clasificación basada en el supuesto de que los componentes tisulares individuales a estudiar están: 1) presentes en número adecuado; 2) inequívocamente identificables en secciones y 3) son similares en tamaño y forma de una parte del tejido a la otra. Esta última condición no es esencial, sin embargo, lo es para un gran número de principios estereológicos.

Por otra parte, Sjöstrom y col. (1982) en “*Morphometric analyses of human muscle fiber types*”, emplearon técnicas morfométricas adicionales a técnicas histoquímicas para la caracterización de los tipos de fibras que no pueden ser diferenciadas únicamente por métodos de microscopía electrónica. Su objetivo fue definir cuantitativamente diferencias estructurales finas entre los tipos de fibras en músculos normales humanos a través de la aplicación de métodos estereológicos y el estudio del efecto de un entrenamiento físico en

los tipos de fibras de acuerdo a los cambios morfológicos, metabólicos y fisiológicos. Sus resultados permitieron determinar 3 categorías de fibras en función de características ultraestructurales y capacidad de adaptación selectiva de la fibra al entrenamiento físico que corresponden bien a los datos bioquímicos, histoquímicos y fisiológicos obtenidos por otros autores. Así, la determinación cuantitativa de la estructura subcelular genera un enfoque relevante en estudios de adaptación selectiva de la fibra por necesidad funcional; e incluso este tipo de estudio podría proporcionar una mejor comprensión de las respuestas específicas del tipo de fibra a las perturbaciones en el suministro de sangre, nervios o a causa de otras miopatías.

No obstante, el investigador Jerusalem F. y col. en el año 1974 con su trabajo titulado “*Morphometric analysis of skeletal muscle capillary ultrastructure in inflammatory myopathies*”, aplica técnicas en morfometría para investigar las anormalidades de los capilares musculares en desórdenes de tejido conectivo asociado a una miopatía. Para ello, se emplearon pacientes con miopatías inflamatorias: dermatomiositis, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico y polimiositis. En sus resultados describen diferencias en la forma, tamaño, área endotelial y luminal, contenidos organelares y grosor de la membrana basal en los capilares normales y afectados (miopáticos). Los hallazgos morfométricos sugirieron diferencias significativas en los parámetros celulares respecto a la condición normal. Con ello, pudieron comprobar la utilización de morfometría para la determinación de diferencias en estructuras subcelulares en condición normal y alterado.

Años más tarde, Finol y col. en el año 1994, describen en su estudio “*Ultrastructure of systemic sclerosis inflammatory myopathy*” las alteraciones ultraestructurales presentes en músculo esquelético de pacientes con esclerosis sistémica. Para ello, tomaron biopsias de músculo *quadriceps femoris* de 7 pacientes, las cuales fueron procesadas por técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión. Sus resultados describen un espectro amplio de cambios que van desde alteraciones del sistema contráctil, de múltiples estructuras subcelulares a alteraciones en la microvasculatura asociada; de esta manera, aporta un mejor conocimiento histopatológico del compromiso muscular que tiene la enfermedad sobre el paciente. Dado que estas alteraciones no se han descrito en forma cuantitativa, este trabajo con el uso de técnicas morfométricas, evalúa y describe las alteraciones ultraestructurales en músculo esquelético de este grupo de pacientes.

OBJETIVOS

GENERAL

Analizar las relaciones morfométricas de las alteraciones ultraestructurales existentes en músculo esquelético *quadriceps femoris* de pacientes con Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP).

ESPECÍFICOS

1. Describir cualitativamente las alteraciones ultraestructurales en músculo esquelético *quadriceps femoris* de pacientes con ESP.
2. Determinar cuantitativamente los parámetros ultraestructurales descritos en músculo esquelético *quadriceps femoris* en individuos normales y en pacientes con ESP.
3. Determinar cuantitativamente las diferencias morfométricas y ultraestructurales descritas en músculo esquelético mediante la aplicación de métodos estadísticos entre la condición normal (control) y alterada (en pacientes con ESP).
4. Evaluar mediante el uso de estadística multivariante las relaciones morfométricas existentes en la ultraestructura de músculo esquelético de los pacientes con ESP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este estudio la población total considerada fue de (7) biopsias: 5 de pacientes previamente diagnosticados con Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP) y dos (2) control (sin miopatías). De los pacientes con ESP se obtuvo cinco (5) biopsias de músculo *quadriceps femoris* suministradas por el servicio de Reumatología del Departamento de Medicina Interna en el Hospital Clínico Universitario de Caracas - Venezuela.

Para efectos de control, se emplearon imágenes de músculo esquelético cedidas por el Dr. Héctor Finol tomadas de biopsias de músculo esquelético de pacientes ingresados a hospitales de Caracas por politraumatismo o herida de bala. Tales imágenes se obtuvieron en el Centro de Microscopía Electrónica “Mitsuo Ogura” de la Facultad de Ciencias – U.C.V.



Figura 10. Esquema general de la metodología empleada para la realización del estudio.

Preparación y observación de biopsia muscular mediante Técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión

1. Preparación de biopsias musculoesqueléticas para su observación por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

La microscopía electrónica es una ciencia cuyo instrumento de observación posee como sistema de irradiación un haz de electrones para la formación de imágenes a diferencia de los microscopios de luz convencionales. Así, la microscopía electrónica de transmisión, es la rama de la microscopía electrónica que tiene la capacidad de formar imágenes a partir de un haz de electrones que incide y atraviesa la muestra proyectándose en una pantalla fluorescente.

Es por esto que la muestra o tejido biológico que se desea observar por microscopía electrónica de transmisión, requiere un procesamiento especializado que le confiera resistencia y algunas propiedades para su posterior observación en el mismo.

1.1. Microscopía electrónica de transmisión – Técnica de Corte Fino

La técnica de Corte fino constituye el procedimiento para la preparación de muestras que se desean observar al microscopio electrónico de transmisión (Finol, 2014). Dicha técnica surge de un conjunto de investigaciones y experimentos desarrollados en su mayoría en los años 50, para garantizar el mantenimiento de la integridad celular post-mortem y observar su condición en ese determinado momento (Afzelius y Maunsbach, 2004); consta principalmente de siete (7) pasos fundamentales previos a su observación: fijación, lavado, deshidratación, infiltración, inclusión, corte y contrastación, tal como señala la figura 11.



Figura 11. Esquema para la preparación del material biológico para ser observado por Microscopía Electrónica de Transmisión. Técnica de corte fino.

1. Fijación

De este modo, una vez obtenidas las muestras de 2mmx1mm de tejido muscular esquelético provenientes de la biopsia lograda por punción percutánea con aguja de Berström (1962), se realizó una doble fijación: a base de aldehídos y a base de osmio. La **prefijación** se realizó de 45min a 1 hora con solución *Karnovsky* (1965), el cual consiste en una mezcla de formaldehído al 37% con glutaraldehído al 2,5%, en Buffer fosfato *Millonig* 0,2M de 320mOsm a pH 7,4.

La fijación se llevó a cabo a una temperatura de 4°C. Transcurrida la primera hora de prefijación, se lavó la muestra con tampón *Millonig* durante 5min a fin de evitar algún daño en la preparación. Seguidamente se realizó la **postfijación** con tetróxido de osmio al 1%

durante una hora bajo las mismas condiciones de temperatura, osmolaridad y pH que en la prefijación de acuerdo a lo establecido por Palade 1952.

2. Lavado

La muestra previamente fijada, se lavó con agua destilada 2 veces durante 5 minutos cada vez. Posteriormente, se realizó una **precontrastación** con solución de acetato de uranilo al 3% por un lapso de 15min.

3. Deshidratación

Tal como señala la tabla 1, el proceso de deshidratación para la extracción de la mayor cantidad de agua posible se realizó por medio de una batería de soluciones de concentraciones crecientes de etanol.

Tabla 1. Batería de soluciones de concentraciones crecientes de etanol

Reactivo	Cambios	Duración (min) c/u
Etanol al 50%	2	5
Etanol al 75%	1	5
Etanol al 90%	1	5
Etanol al 100%	2	5

Todos los pasos descritos se llevaron a cabo a una temperatura de 4°C hasta el cambio con etanol al 75%.

4. Infiltración

Esta etapa consiste en la sustitución del etanol por óxido de propileno, facilitando de este modo, la inclusión del tejido en un medio sólido para la obtención de cortes y el

desplazamiento definitivo del etanol en la muestra. Se llevó a cabo, por medio de dos (2) cambios de quince (15) minutos cada uno de óxido de propileno, seguido de un único cambio de óxido de propileno – resina proporción 1:1 con una duración de treinta (30) minutos.

5. Inclusión

La mezcla y el procedimiento para la inclusión utilizada fue la sugerida por el Dr. Héctor Finol en su guía de *Técnica del corte fino para microscopía electrónica de transmisión*, como señala la tabla 7; sugerida por primera vez por Luft (1961), seguido por Maaloe y Birch-Andersen (1956) y Glauert y col. (1956).

Tabla 2. Proporción de compuestos para inclusión en resinaepóxica (Epón-812)

Reactivo	Cantidad (mL)
EMbed- 812	9,0
DDSA	6,0
NMA	5,0
DMP-30	0,5

*EMbed-812: sustituto epón-812. DDSA: Dodecenylsuccinic anhydride (Anhídrido dodecínico succínico). NMA: Nadic Methyl Anhydride (Anhídrido metil nádic). DMP-30: 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol.

Para garantizar una buena inclusión de la resina sobre el material biológico se llevaron a cabo 3 cambios en resina pura de 30min cada uno y un último cambio sobre un molde donde ésta polimeriza para la formación del bloque o taco que será cortado (Figura 2) según lo establecido por Luft en 1961. Una vez incluido el material biológico al molde con resina pura, se colocó en una estufa a 60°C durante 48 horas.

6. Corte (Ultramicrotomía)

Los cortes se obtuvieron con ayuda de un ultramicrotomo Porter Blum MT2-B (SORVALL®). Las secciones obtenidas fueron de 60-90nm de grosor.

Estas secciones se colocaron sobre unas rejillas de cobre de 150mesh cubiertas con una película de nitrocelulosa (colodión), confiriéndole una superficie de soporte y adherencia al corte para resistir la incidencia del haz sobre la misma. Estas películas tienen un grosor de 20-40nm y se obtienen a partir de una gota sobre una superficie de agua destilada formando una membrana con un patrón de colores conocidos como colores de interferencia.

7. Contraste según Santander (1968)

A. Procedimiento de contrastación con *acetato de uranilo* al 3% (Watson, 1958)

Una vez la muestra en la rejilla, se preparó una cámara húmeda con gotas de agua dentro de una cápsula de Petri. En su interior se colocaron tantas gotas de solución de uranilo como muestras se contrastaron, éstas se disponen con la rejilla con los cortes en contacto con la solución. Se dejaron durante 30min en una estufa a 60°C. Posteriormente, se lavaron las rejillas tres veces en agua destilada durante dos minutos cada uno (agitándolas a través de la superficie). Finalmente se secaron sobre papel de filtro.

B. Procedimiento de contrastación con *citrato de plomo* (Reynolds, 1963)

De forma previa, se preparó una cámara seca con perlititas de NaOH para extraer el dióxido de carbono en la atmósfera y evitar la contaminación de los cortes. Tal como con la solución anterior, se dejaron flotar las rejillas con los cortes en contacto con la solución de plomo durante 30min. Nuevamente se lavan con agua destilada y se colocan sobre un papel de filtro seco dentro de la cápsula de Petri.

8. Observación e interpretación de las micrografías electrónicas

Esta etapa consiste en introducir la rejilla con la muestra previamente contrastada al microscopio electrónico de transmisión. Los equipos tecnológicos empleados para este trabajo fueron los microscopios Hitachi H-500 y el microscopio FEI Quanta 250 FEG en modalidad STEM. En esta etapa del estudio, se hizo fundamental la exploración y el conocimiento previo de la estructura celular del tejido muscular esquelético (componentes, formas y funciones) y sus organelos constituyentes para la identificación de las variables que serán fundamentales en el análisis morfométrico del estudio, que puedan aportar información concluyente o esencial en el estudio.

La interpretación de imágenes en microscopía electrónica de transmisión simboliza un gran reto para aquellos que en el inicio de la técnica, han querido darle sentido a lo prescrito teóricamente. No obstante, para el investigador resulta un proceso complejo dado que debe existir una correspondencia del modelo biológico (músculo esquelético) que se estudia con lo observado en la imagen obtenida (micrografía), pero su complejidad reside en la

capacidad de describir el objeto considerando los diferentes factores que pueden tener un efecto en la organización y composición química de las estructuras biológicas, y que éstos constituyen un aporte importante en la formación de la imagen. Por consiguiente, se hizo necesaria la comprensión del funcionamiento y física del microscopio electrónico de transmisión, estructura y función del tejido y los fundamentos de los procedimientos de preparación, composición e interacciones químicas del tejido biológico con algunos agentes de la preparación, a fin de dar una explicación cónsona y coherente de lo observado a nivel ultraestructural, a partir de los patrones en escala de grises de las estructuras observadas en las micrografías. Esto para hacer posible su posterior evaluación cuantitativa de estas estructuras que componen los elementos del tejido muscular esquelético observado en cada una de ellas.

2. Análisis Cuantitativo

1.1. Análisis Morfométrico

Se obtuvo para el estudio 60 imágenes con el microscopio FEI Quanta 250 FEG en modalidad STEM; además se contó con 40 imágenes suministradas por el Dr. Héctor Finol, las cuales se obtuvieron con el microscopio Hitachi H-500, éstas fueron posteriormente digitalizadas para el tratamiento con un software de medidas.

Las evaluaciones métricas de las múltiples estructuras de interés a evaluar en el estudio, se determinaron a partir del software ImageTool v. 3.0 en correspondencia al aumento original

de la imagen. De cada condición (control y alterado) se estimaron cien (100) medidas por variable morfométrica (parámetro celular) consideradas de importancia en el estudio.

2.1.1. Digitalización de la Imagen

Para el estudio descriptivo y cuantitativo de las biopsias de músculo esquelético a partir de una micrografía, es fundamental el aumento empleado para su registro y el factor de magnificación con que se obtuvo la imagen física revelada. Así, las imágenes obtenidas directamente del microscopio electrónico Hitachi H-500, incluyen y mantienen el tamaño acorde al aumento original con que se obtuvo; no obstante, muchas de las imágenes empleadas en este trabajo, fueron digitalizadas y editadas para la obtención de medidas a través de la herramienta informática. Todas las imágenes digitalizadas conservaron el aumento real y la escala original. Por otra parte, las imágenes obtenidas por el equipo FEI Quanta 250 FEG, se almacenaron de forma automática (digital) para su posterior utilización en el software.

2.1.2. Selección de variables

Para la selección de las variables a medir, se hizo necesaria la descripción cualitativa de la imagen observada contemplando la fisiología, funcionamiento, estructura y composición del tipo celular o tejido muscular esquelético durante la etapa de observación por MET. Así, para generar hipótesis a partir de ésta, se observó y se reconoció el comportamiento de la estructura celular dadas las diferentes condiciones presentes (normal y alterado). En ese sentido, y en correspondencia a la relación existente en estructura-función de la célula en

las distintas condiciones en que se observan los patrones ultraestructurales, se seleccionaron las siguientes variables:

En la fibra muscular se consideró: ancho de la membrana basal de la fibra muscular (AMBfm), espacios intermiofibrilares (EI), área mitocondrial (AM), diámetro mayor de la mitocondria (DMm), ancho de la línea Z (BZ), densidad de mitocondrias (Dens mit) y porcentaje de atrofia (%A).

En la microvasculatura asociada, se midió: ancho de la membrana basal de la microvasculatura (AMBm), grosor del endotelio capilar (endotelio), diámetro de la luz capilar (Diám cap), densidad de cavéolas y vesículas pinocíticas (Dens cav) y área de la luz capilar (área luz). De todas las variables mencionadas anteriormente se tomaron cien (100) medidas de cada parámetro en cada condición.

Las variables como %A, se determinaron a partir de una cuadrata de secciones de $1\mu\text{m}^2$, en el cual, la porción correspondiente al recuadro, simboliza el 100% sobre la fibra muscular. No obstante, parte de estas secciones no formaban parte de la región atrófica del músculo; por ende, esta área particular dentro de $1\mu\text{m}^2$ corresponde a un determinado porcentaje. Todas ellas, fueron estimadas y promediadas al final del proceso de medición.

2.1.3. Calibración del Software y toma de medidas

De acuerdo al número de micrografías y biopsias obtenidas, se establecieron los parámetros a medir; es decir, las medidas dependen de: la estructura observada en ella, aleatoriedad y reproducibilidad del mismo, de modo que si observamos una misma estructura en más de una micrografía, podremos medir algún parámetro en cada una de ellas. Dicho esto, para la toma de datos, fue importante la calibración del software en función del aumento de la imagen. Esto fue posible a través de la relación que existe entre el aumento (A), el tamaño del objeto en la imagen (Ti) y el tamaño real del objeto (To):

$$T_o = \frac{T_i}{A}$$

El tamaño del objeto en la imagen (Ti), es la que obtenida directamente a través de un instrumento de medida a simple vista sobre la micrografía en físico; con ésta, se generó una conversión a micras usadas por convención en microscopía electrónica; para ésta, generalmente se coloca una barra de longitud conocida que llamaremos objeto sobre la imagen. De allí, se calibró el software dándole a esta medida de longitud conocida (objeto) en micras; de modo tal que para el software 1cm, de acuerdo a la relación anterior y al aumento de la imagen, equivale a un determinado número en micras en tamaño real.

Así, el software generó medidas reales aproximadas de: longitud, área, densidad, conteo discreto, entre otros en términos de unidades micrométricas.

1.2. Análisis y aplicación de un método estadístico

Una vez definidas las variables a medir, las condiciones de toma de medida y aleatorización, se generó una base de datos que se empleó para la aplicación de un método estadístico a fin de establecer una comparación de estas variables o parámetros entre la condición normal y alterada. La base de datos obtenida a partir de la recolección de medidas del software, fue modificada y reorganizada en función de las múltiples herramientas estadísticas utilizadas, por ello, se expondrá la matriz general del estudio. De esta manera, la aplicación de estadística genera un criterio de identificación y determinación de posibles diferencias con un porcentaje de confianza o significancia que permite tomar decisiones concluyentes respecto a las variaciones descritas.

De este modo, se utilizaron diversos métodos estadísticos para la comprobación de diferencias morfométricas entre las condiciones antes mencionadas; entre ellos:

- Estadística descriptiva (Tablas y gráficos de media aritmética y desviación estándar)

Éstos se realizaron a fin de facilitar la percepción visual y comprensión de los datos; utilizado fundamentalmente para establecer comparaciones de un conjunto de datos, esto responde a los objetivos de este trabajo cuya idea principal es comparar las variaciones morfométricas existentes entre la condición normal y alterada (en pacientes con ESP).

- Comparación de medias (ANOVA, T-Student)

Se hizo uso de un análisis T-Student para hacer una comparación de medias en variables cuantitativas de parámetros celulares en dos grupos (normal y alterada). En función de la naturaleza de los datos y el cumplimiento de los supuestos, se emplearon pruebas paramétricas y no paramétricas (U de Mann-Whitney) para las variables que no cumplieron con los supuestos, entre ellos normalidad y homogeneidad de varianza.

- Matrices de Correlación (Spearman o Pearson)

Éstas permitieron establecer una idea a priori de la relación o la fuerza de asociación que existe entre las variables cuantitativas seleccionadas en el estudio y si éstas, responden de alguna forma a la condición (normal o alterada). Es decir, los coeficientes de correlación de Pearson reportados permitieron medir la fuerza de relación entre las variables morfométricas en cada condición (normal y alterada); y además, conocer si la relación de estas variables cambian de la condición sana al enfermo. Los coeficientes de correlación de las variables en estudio dependieron de su propia naturaleza, de igual manera, varían entre -1 y +1, siendo estrecha su relación por su valor cercano a 1.

- Análisis de Componentes Principales (ACP)

Este análisis a través de una reducción dimensional, permitió describir de forma gráfica la segregación o dispersión de una población de medidas en función de las múltiples variables morfométricas del estudio. De esta forma, reconocer, en correspondencia a los coeficientes de correlación por componente, si existen variables específicas que expliquen el patrón de dispersión o separen con mayor fuerza las condiciones iniciales de dicha población.

- Regresión logística simple y múltiple

La regresión logística permitió expresar la probabilidad de que ocurra un evento (en este caso la enfermedad) como una función de las variables morfométricas; es decir, predecir la presencia de la enfermedad a partir de estas variables. El análisis se interpreta de forma análoga a la regresión múltiple, con la diferencia que la variable dependiente es dicotómica (normal o alterado). Así, la regresión logística simple, se realizó a fin de conocer el peso y significancia de cada variable sobre la condición y establecer si aumenta o disminuye en presencia de la enfermedad. Por otra parte, la regresión logística múltiple nos permitió definir cuáles de las variables morfométricas realmente explican la presencia de la enfermedad.

- Regresión múltiple y Análisis de Ruta

Se empleó para determinar la relación que existe entre las variables independientes (morfométricas) sobre la variable dependiente (morfométrica significativa). En este caso particular, las variables morfométricas que resultaron significativas en el análisis de regresión logística múltiple fueron las empleadas en este modelo de regresión (%A, DMm, BZ y área de la luz) a fin de establecer y explicar su significancia en la condición alterada por el resto de las variables morfométricas. En ese sentido, las variables dependientes son las significativas y las variables independientes, el resto de las morfométricas; esto permitió determinar que la significancia de las mismas también viene dada por influencia o presencia de otras variables morfométricas asociadas a la enfermedad. Por tanto, se realizó

una Regresión Lineal Múltiple paso a paso (*stepwise*) hacia adelante (*forward*) modificando los niveles de significancia con un $f\ to\ enter=3$ y $f\ to\ remove=2$.

El diagrama de rutas contempla las relaciones de las variables dependientes y su coeficiente de regresión lineal múltiple asociada, permitiendo de esta manera facilitar la interpretación y comprensión de las relaciones y dependencias entre las variables de la muestra en estudio.

Los programas utilizados en este estudio para los análisis estadísticos fueron: STATISTICA, MVSP, SPSS.

RESULTADOS

Para la presentación de los resultados obtenidos, fueron agrupados en dos secciones: la primera corresponde a la evaluación y descripción cualitativa de las imágenes obtenidas por el microscopio electrónico de transmisión (Figuras 12-26). Dentro del conjunto de imágenes, las figuras 12 y 13 corresponden a los grupos controles tanto de la fibra muscular esquelética como del capilar asociado. El resto de las imágenes forman parte del grupo alterado obtenido de las biopsias del músculo esquelético de pacientes con Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP).

La segunda sección de resultados corresponde al conjunto datos y tablas del análisis cuantitativo, entre los que se describen: tablas de estadística descriptiva y comparación de medias, seguida de las matrices de correlaciones, tablas y gráficos del análisis de componentes principales, regresión logística simple y múltiple, regresión lineal múltiple estándar y de variables significativas y finalmente, los gráficos correspondientes al análisis de ruta. Cada una de estas pruebas y descripciones permiten comprender la importancia que tienen las variables morfométricas en la condición normal y sus diferencias o posibles relaciones con la condición alterada, además de reconocer e identificar algunas variables que pueden ser determinantes en la condición enferma del músculo esquelético en pacientes con ESP.

1. Análisis Cualitativo – Interpretación de las micrografías electrónicas obtenidas

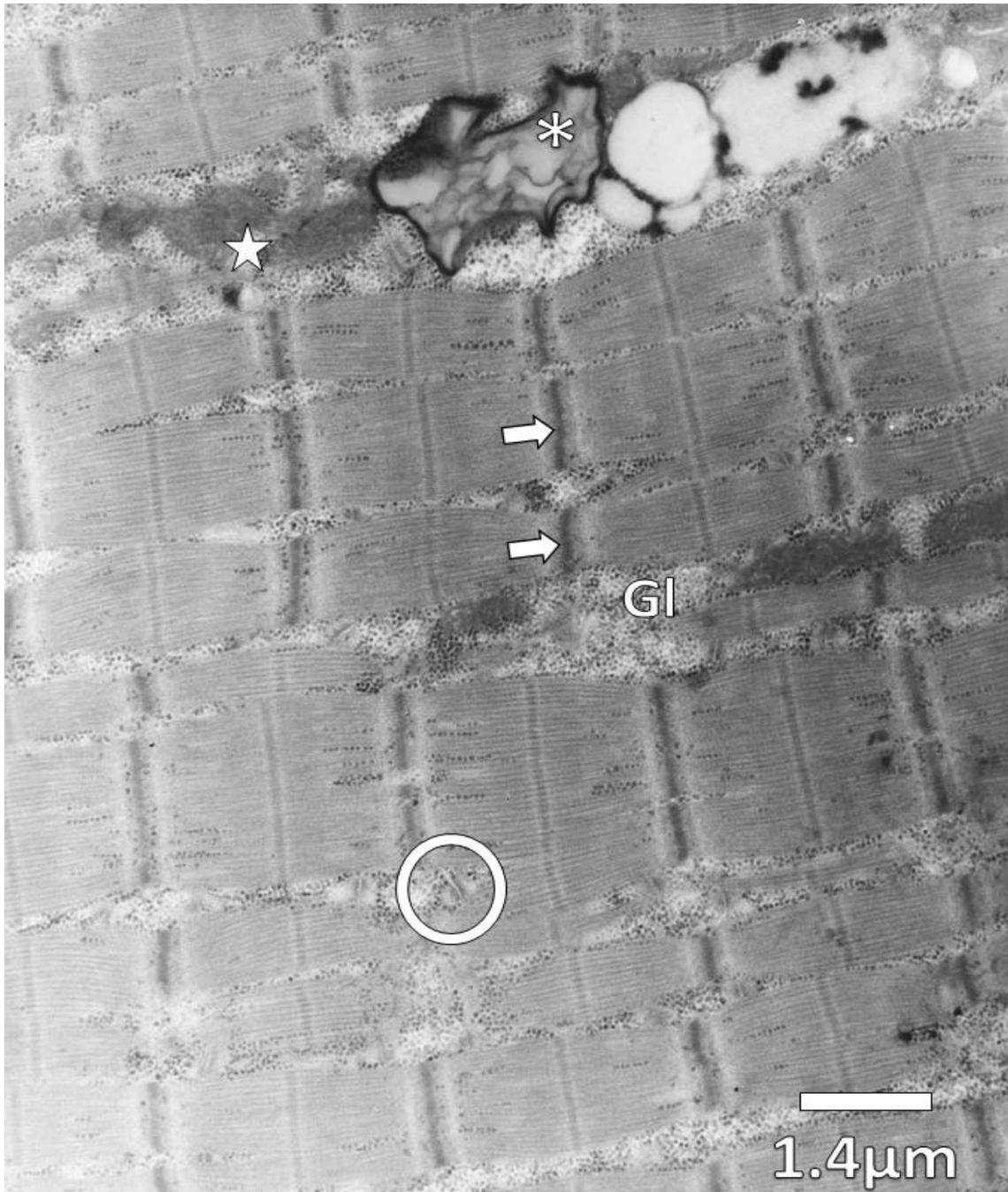


Figura 12. CONTROL. Sección longitudinal de fibra muscular esquelética con línea Z de trazado regular recto (flechas) El sistema sarcotubular con tríadas dispuestas en la unión de las bandas A e I (Aro), así como mitocondrias localizadas en los espacios intermiofibrilares (estrella), un gránulo de lipofuscina (asterisco) y abundantes gránulos de glucógeno tipo β (GI).

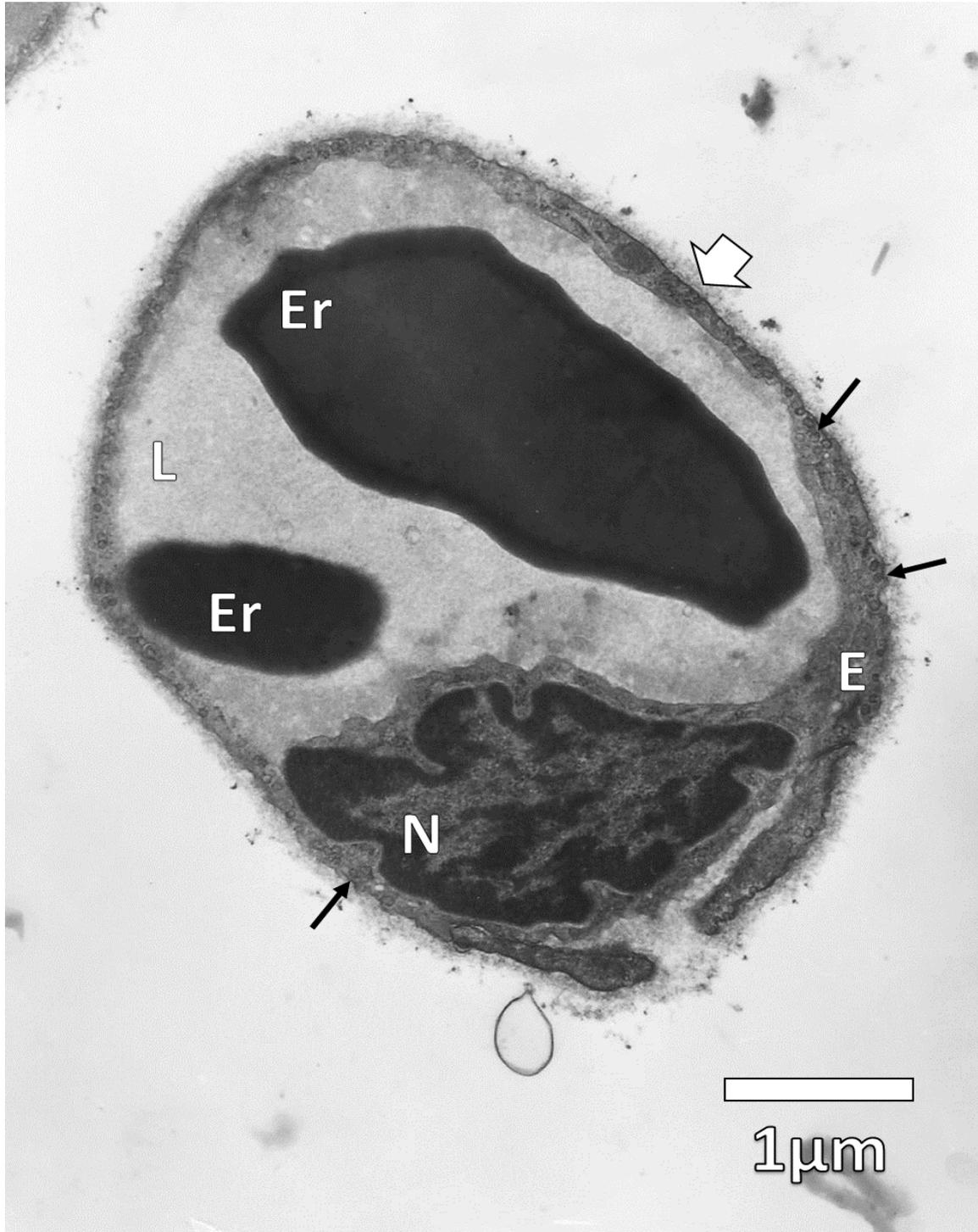


Figura 13. CONTROL. Sección de capilar presentando una membrana basal (flecha gruesa) y un citoplasma endotelial (E) con abundantes cavéolas y vesículas pinocíticas (flechas finas); además se observa un núcleo bastante electrondenso (N). Nótese un par de eritrocitos (Er) en el lumen capilar (L).



Figura 14. Sección longitudinal de fibra muscular esquelética. Se observa en la fibra superior desorganización de las miofibrillas con líneas Z de grosor muy irregular (flechas), mitocondrias de densidad electrónica normal (estrella) y una tríada prominente con cisternas terminales electrondensas (aro). Se observa además fragmentación del sistema sarcotubular (cruz) y la membrana basal engrosada (MB) con un plegamiento alargado de la fibra (cabeza de flecha). En el centro de la imagen se observa un mastocito degranulándose (M). La otra sección de fibra inferior, se observan abundantes plegamientos del sarcolema (cabeza de flecha) y engrosamiento de la membrana basal (MB). Las miofibrillas hipercontraídas y las mitocondrias hinchadas con crestas en disposición irregular (rombo).

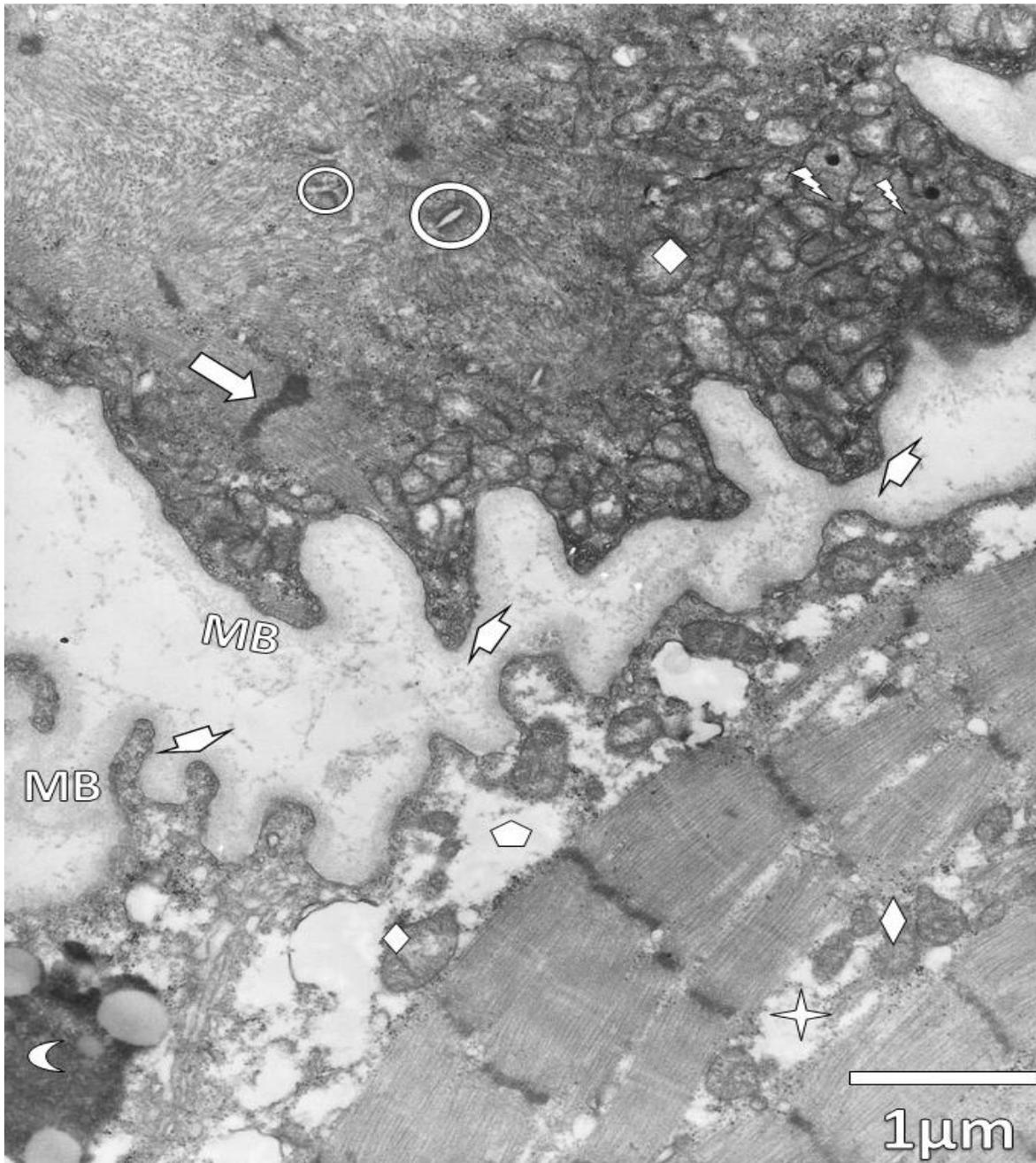


Figura 15. Sección longitudinal de fibra muscular esquelética. La fibra superior se encuentra en completa desorganización de las miofibrillas con líneas Z de grosor y forma irregular (flecha), las mitocondrias están hinchadas con disminución de crestas (rombo) y un par de mitocondrias con gránulos osmeofílicos (rayos), un par de tríadas prominentes (aros) y membrana basal engrosada (MB) con plegamientos gruesos del sarcolema (cabezas de flechas). La sección de fibra inferior, presenta plegamientos del sarcolema de diferente grosor (cabezas de flecha). El espacio subsarcolémico (pentágono) y los intermiofibrilares (estrella de cuatro puntas) se encuentran ampliados. Las miofibrillas están ligeramente contraídas y las mitocondrias levemente hinchadas (rombos) con diferentes números de crestas, además se aprecia un gránulo de lipofucsina (media luna).

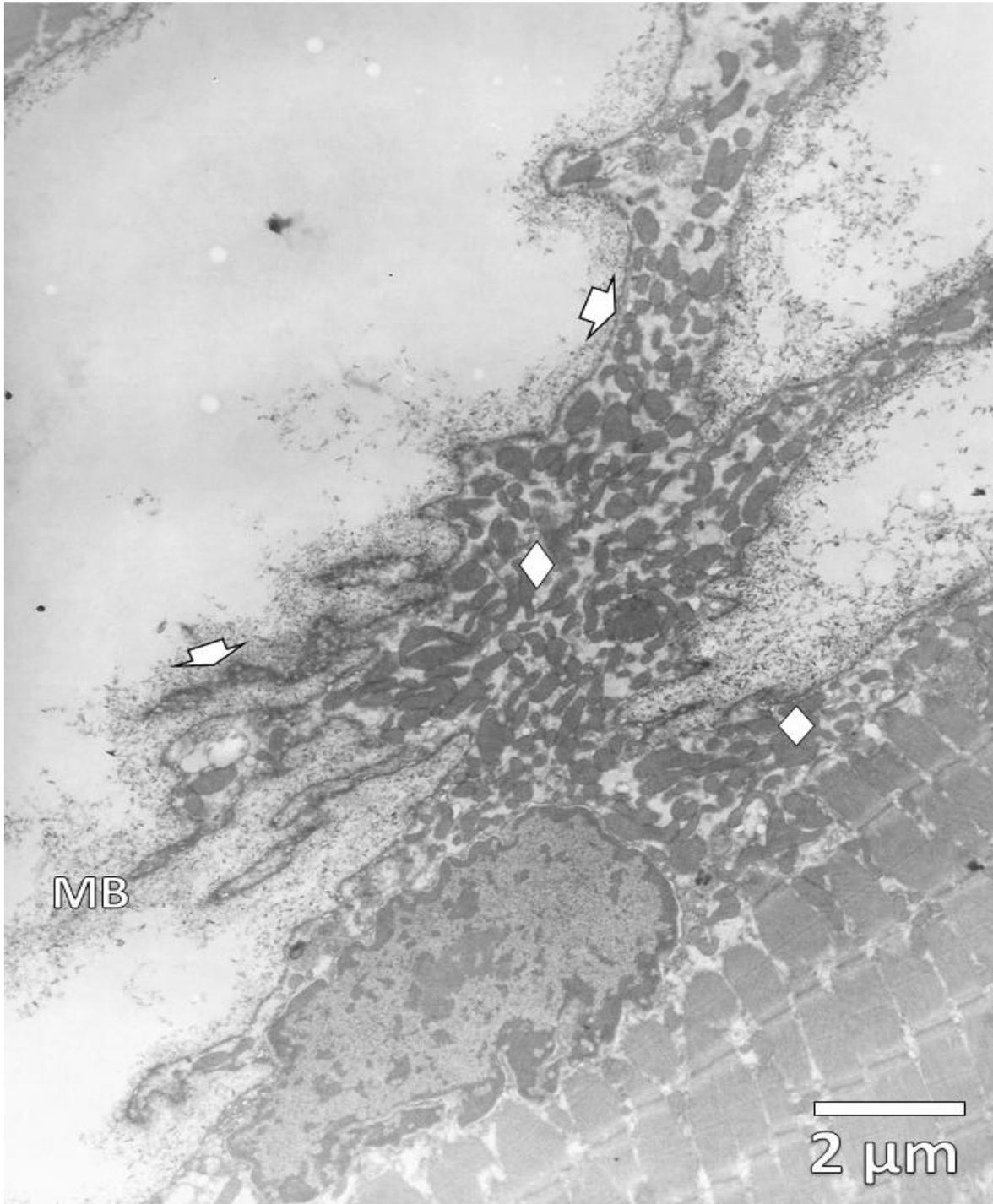


Figura 16. Sección longitudinal de fibra muscular esquelética. El espacio subsarcolémico (rombos) está formado por plegamientos del sarcolema (cabezas de flechas) y está ocupado por mitocondrias, mucho más abundantes que en los espacios intermiofibrilares de una fibra normal. La membrana basal se observa engrosada y reduplicada (MB).

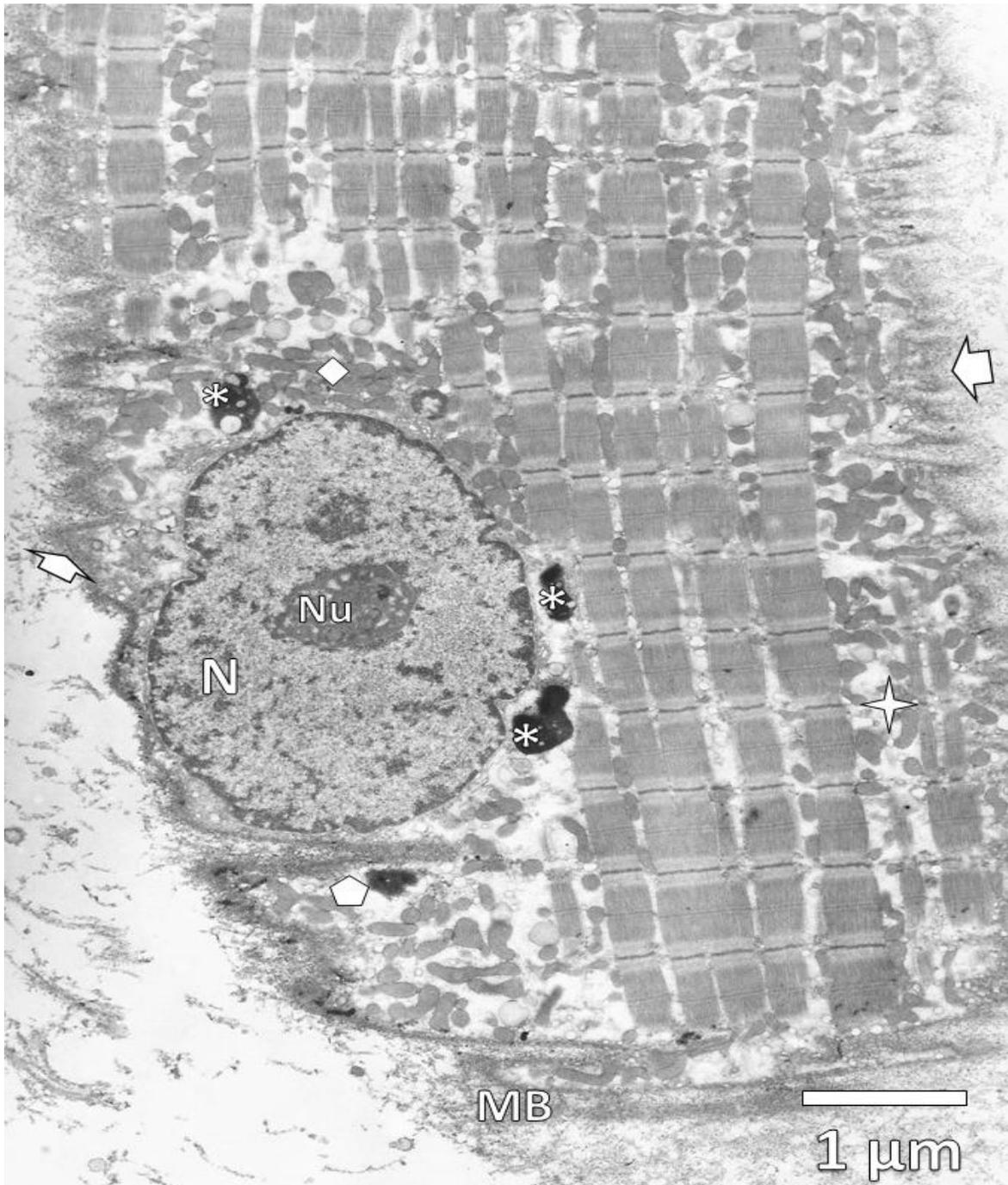


Figura 17. Sección de fibra muscular esquelética atrófica (escaso diámetro) con abundantes plegamientos del sarcolema (cabeza de flecha) y membrana basal engrosada (MB). Los espacios intermiofibrilares (estrella de cuatro puntas) y subsarcolemico (pentágono) están agrandados. Las miofibrillas presentan líneas y bandas características. Las mitocondrias son abundantes y de densidad electrónica de la matriz uniforme (rombo). El núcleo (N) presenta nucléolo (Nu) redondeado, está rodeado por gránulos de lipofuscina (asteriscos) y mitocondrias (rombo).

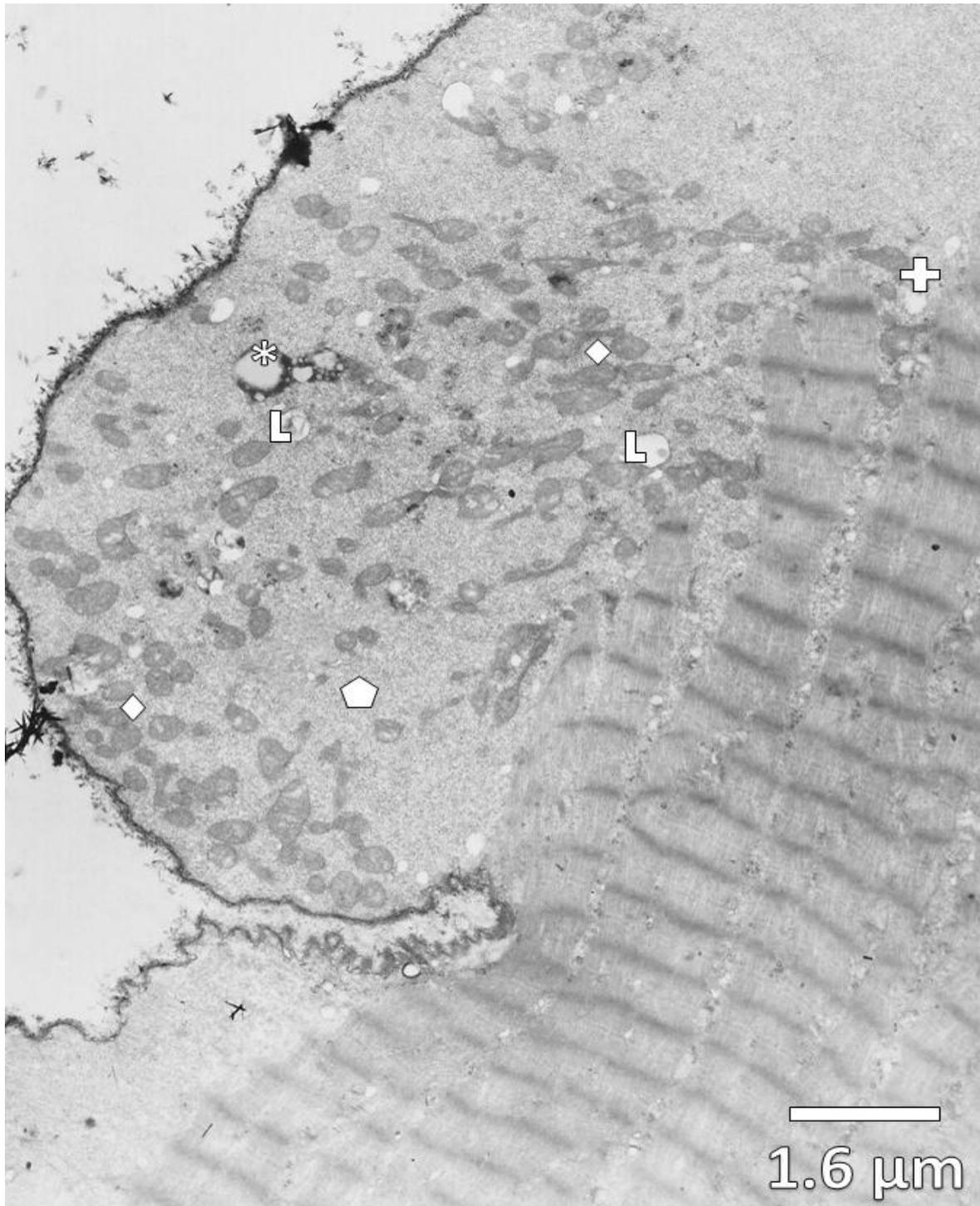


Figura 18. Sección de fibra muscular esquelética con espacio subsarcolémico (pentágono) muy agrandado con mitocondrias de formas y densidad electrónica diversa (rombos). Se aprecian también gotas lipídicas (L), gránulos de lipofucsina (asterisco) y algunas vesículas provenientes de la fragmentación del sistema sarcotubular (cruz). Las miofibrillas se encuentran hipercontraídas.



Figura 19. Sección de fibra muscular esquelética en el que se observa un macrófago (estrella de 6 puntas). La fibra presenta membrana basal muy engrosada (MB), espacio subsarcolemático ampliado (pentágono) y una vacuola autofágica (asterisco). Las miofibrillas presentan las líneas Z engrosadas y de trazado irregular (fechas). El núcleo es subsarcolemático (N), ligeramente engrosado y se aprecian algunas tríadas prominentes (aro).



Figura 20. Sección longitudinal de fibra muscular esquelética. En la fibra superior se observan plegamientos del sarcolema (cabezas de flecha), espacios intermiofibrilares (estrella de 4 puntas) y subsarcolemícos (pentágono) ampliados. El sistema sarcotubular fragmentado e hinchado (cruz), las mitocondrias de formas variadas y de matriz electrodensa (rombos). Miofibrillas hipercontraídas y el núcleo (N) está invaginado con su envoltura ligeramente hinchada. La célula satélite (S) presenta además del núcleo (Ns), retículo endoplasmático rugoso (rayo), un gránulo de lipofuscina (media luna). En la sección de fibra inferior, los componentes del sistema sarcotubular están ligeramente hinchados (aro); presenta plegamientos del sarcolema (cabeza de flecha) con engrosamiento de la membrana basal (MB), mitocondrias abundantes (rombo) y de matriz electrodensa; los espacios intermiofibrilares aumentados (estrella 4 puntas).

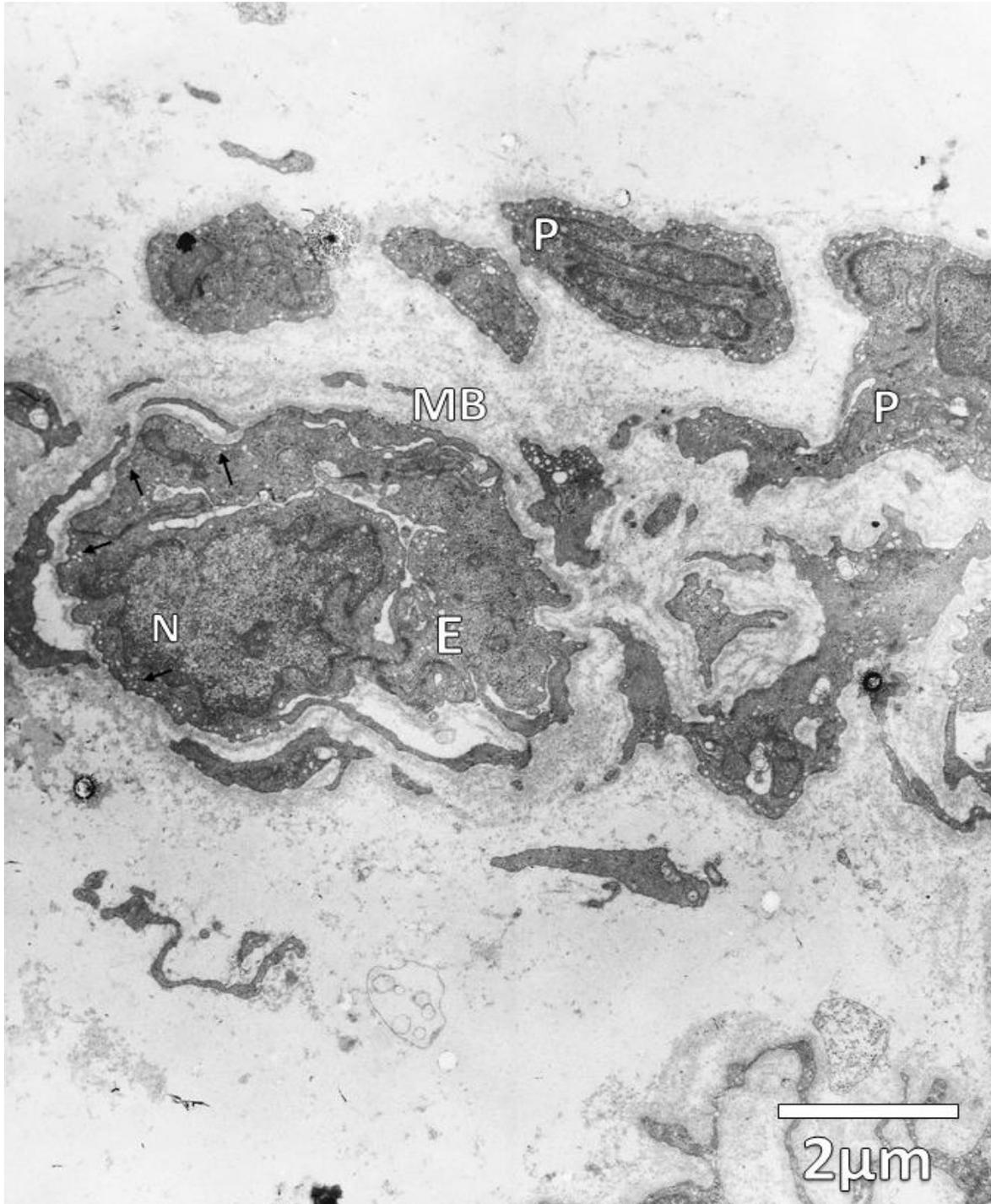


Figura 21. Sección transversal de microvasculatura asociada a tejido muscular esquelético. El capilar se encuentra ocluido, el endotelio (E) engrosado y la distribución de las vesículas pinocíticas y cavéolas de forma irregular (flechas finas). Núcleo (N) con contornos irregulares, membrana basal reduplicada (MB) y se observan porciones de más de un pericito (P).



Figura 22. En la sección de fibra muscular, se observa desorganización de las miofibrillas con porciones excesivamente atróficas y membrana basal muy engrosada (MB). El capilar (Ca) se observa parcialmente ocluido, lumen estrecho (L), las cavéolas y vesículas pinocíticas están disminuidas (flechas finas), las mitocondrias lucen hinchadas (asteriscos) y núcleo (N) con abundante cromatina. La membrana basal del capilar está engrosada y en algunos sitios reduplicada (MB*). Se observan también mitocondrias hinchadas (estrella 4 puntas) en el pericito (P).

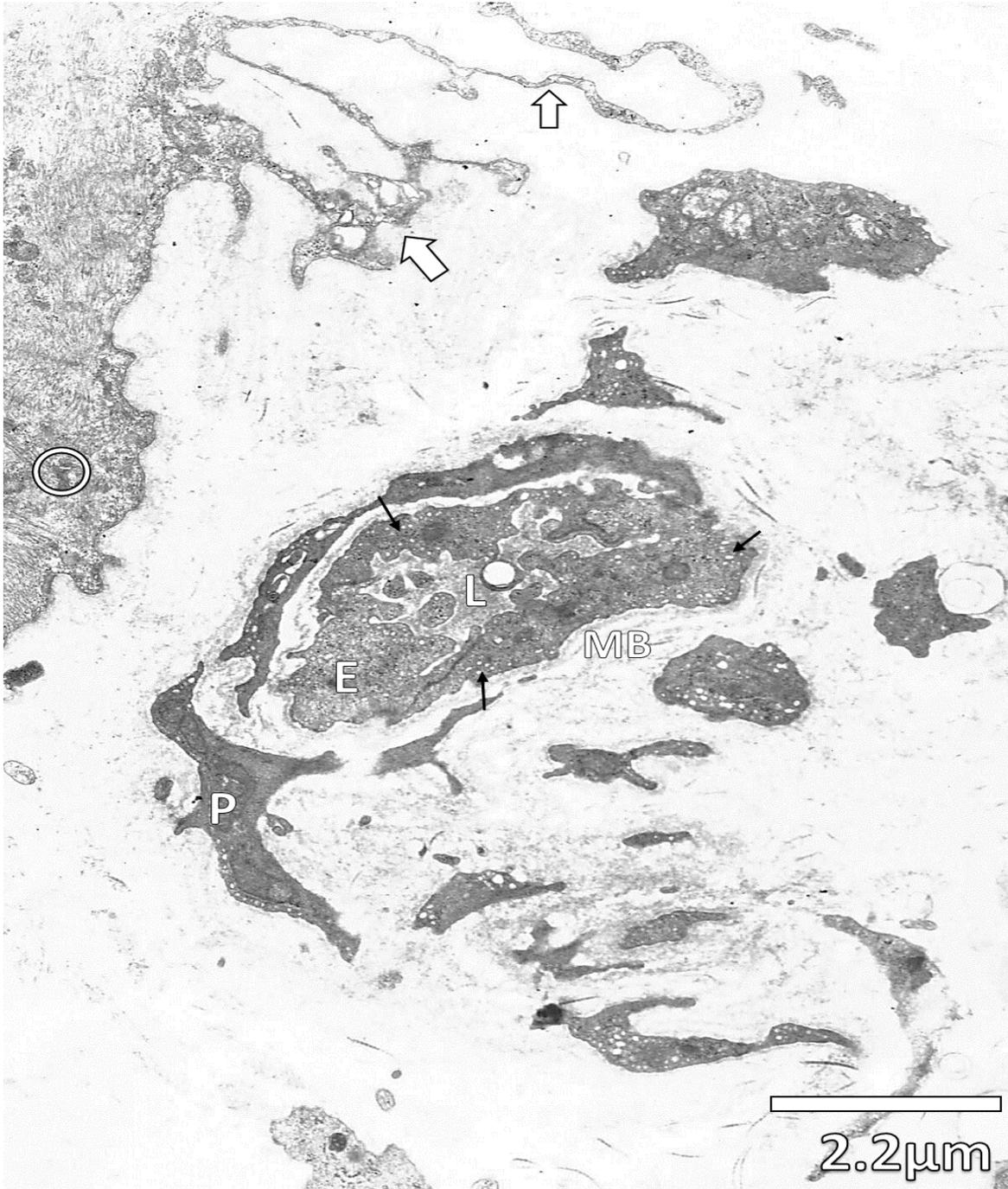


Figura 23. En la sección de fibra en el margen superior, se encuentra el sistema contráctil desorganizado, una tríada prominente (aro) y de ella sobresalen porciones muy atróficas (flechas gruesas). En la sección transversal del capilar, se exhiben prolongaciones del endotelio (E) hacia la luz (L), las cavéolas y vesículas pinoécíticas están distribuidas de forma irregular (flechas finas) y membrana basal engrosaada y algunas porciones reduplicada (MB). Se observan porciones del pericito con cantidad variable de vesículas y cavéolas.

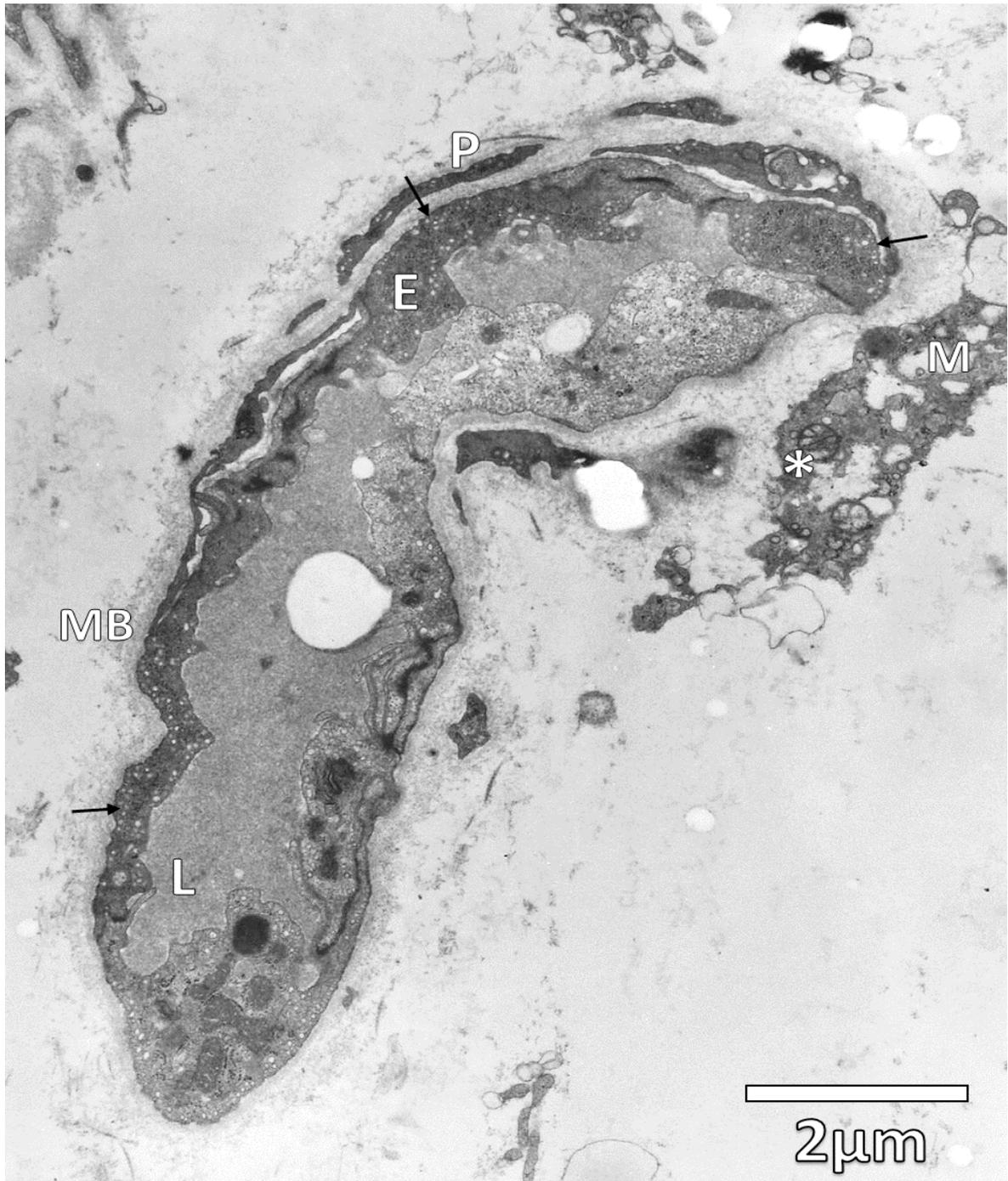


Figura 24. Sección transversal de capilar. El endotelio de diferente grosor y densidad electrónica (E), en las áreas electrondensas las vesículas pinocíticas y cavéolas son más abundantes que en las zonas electrón claras (flechas finas). Área de la luz ocluida sección superior derecha del capilar (L). Se aprecian algunas porciones del pericito (P) y a la derecha, una porción de un macrófago (M) con contornos irregulares, mitocondrias hinchadas (asterisco) y área del citoplasma vacuolizada.



Figura 25. Sección de fibra muscular esquelética con áreas muy atróficas, hipercontracción del sistema contráctil y desorganizado. Del sistema sarcotubular se observan algunas vesículas aisladas (flechas gruesas). La membrana basal muy engrosada (MB). La sección del capilar (Ca), muestra luz ocluida (L), con vesículas pinocíticas y cavéolas distribuidas irregularmente (flechas finas). La membrana basal está engrosada (MB*). En el endotelio capilar se observa unas mitocondrias (asterisco) y un centriolo (cabeza de flecha). Se aprecia la porción del pericito (P) que contiene al núcleo con vesículas y cavéolas distribuidas irregularmente.

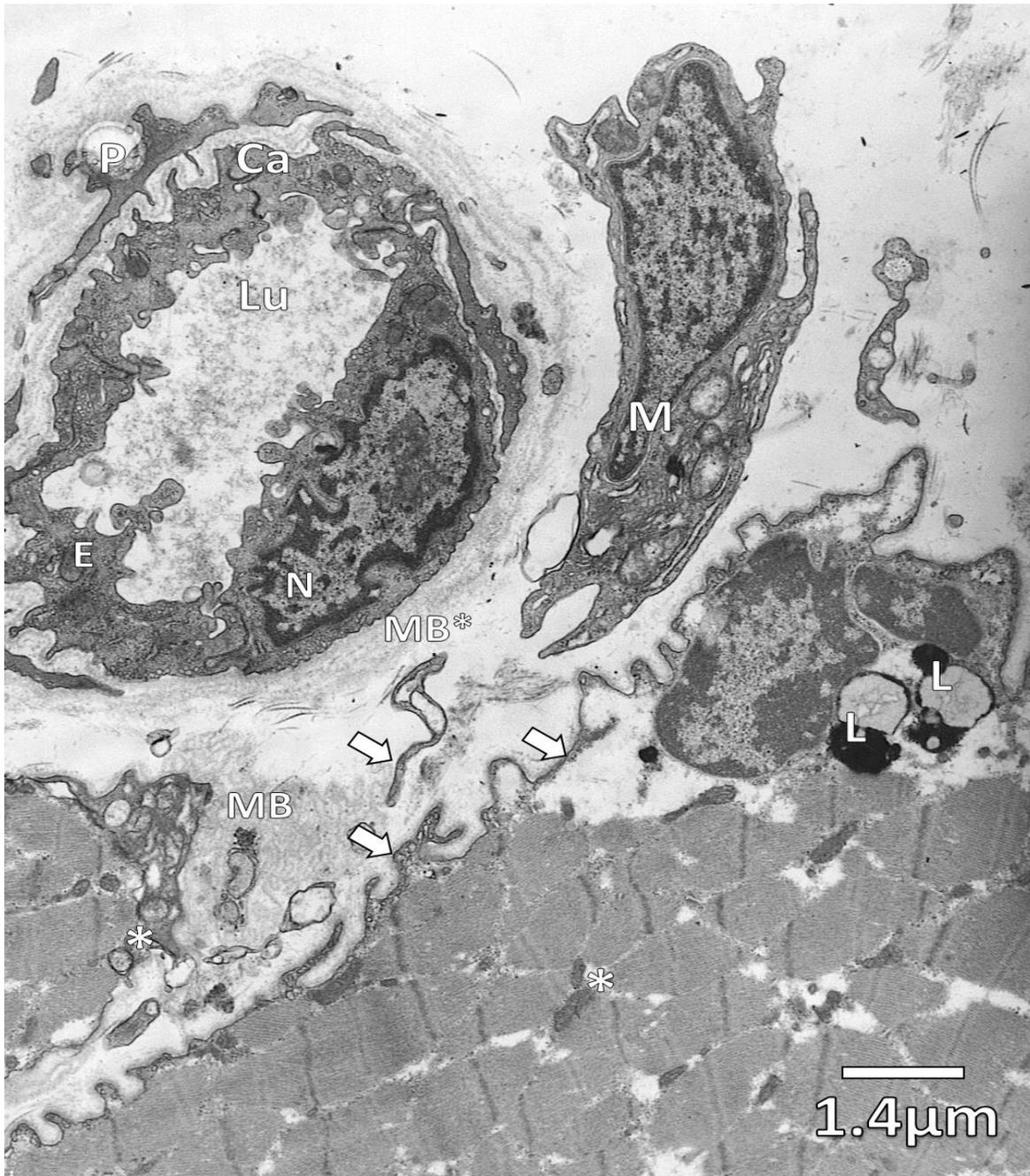


Figura 26. La sección del capilar (Ca) muestra un citoplasma engrosado con prolongaciones del endotelio (E) hacia la luz (L), pocas vesículas y cavéolas. Membrana basal reduplicada (MB*), y las porciones del pericito presentan pocas cavéolas y vesículas (P). Al lado derecho del capilar se aprecia un macrófago (M) y dos secciones de fibra inferiores con prolongaciones del citoplasma hacia el espacio extracelular (flechas gruesas). Las fibras musculares esqueléticas de la sección inferior exhiben mitocondrias electron densas (asteriscos). El núcleo de una de las fibras se presenta con gran cantidad de heterocromatina por ser el corte periférico, además se observa ligeramente engrosado y con gránulos de lipofuscina (L); se nota una porción muy reduplicada de la membrana basal (MB).

2. Análisis Cuantitativo: tratamiento de datos morfométricos obtenidos

2.1 Estadística descriptiva y comparación de media aritmética de las variables morfométricas en la condición normal (control) y alterado (pacientes con ESP):

Como estadísticos descriptivos se estimó el promedio y la desviación estándar de las variables mesurables para el control y la condición alterada (Tabla 3). Adicionalmente se evaluó la distribución normal y homogeneidad de los datos (apéndice 1). Se realizó una prueba T- Student para variables que cumplen con los supuestos y una prueba U de Mann-Whitney para las que no, a fin de comparar ambas condiciones. Tales pruebas demuestran que todas las variables medidas presentan diferencias estadísticamente significativas entre la condición normal y alterado ($p < 0.05$; Tabla 3)

Tabla 3. Cuadro obtenido a partir de un análisis de comparación de medias T-Student ($\alpha=0.05$) de las variables morfométricas (Am, DMm, Diám cap y Area luz) en condición normal (control) y alterado (con ESP). El análisis de U de Mann-Whitney se aplicó para las variables: AMBm, AMBfm, EI, %A, BZ, Dens mit, Endotelio y Dens cav; todas exhibiendo diferencias estadísticamente significativas entre la condición normal y alterado ($p < 0.05$).

Variables	Media (Normal)	Desv estándar	Media (Alterado)	Desv estándar	T-exp/ U Mann W.	<i>p</i>
AMBm (μm)	0.10	0.07	0.28	0.09	U= -10.6	0.000
AMBfm (μm)	0.15	0.075	0.39	0.13	U= -10.9	0.000
EI (μm)	0.058	0.08	0.35	0.13	U= 10.9	0.000
%A	3.64	17.26	60.58	27.55	U= -11.5	0.000
Am (μm^2)	0.11	0.06	0.15	0.06	T= -4.49	0.000
DMm (μm)	0.46	0.14	0.60	0.17	T= -6.13	0.000
BZ (μm)	0.069	0.045	0.15	0.07	U= -8.5	0.000
Dens mit (mit/ μm^2)	1.41	0.43	1.72	0.67	U= -3.47	0.000
Endotelio (μm)	0.25	0.16	0.88	0.34	U= -11.3	0.000
Diám cap (μm)	2.84	0.69	0.61	0.64	T= 23.62	0.000
Dens cav (cav/ μm^2)	85.15	29.5	16.68	19.8	U= 10.8	0.000
Area luz (μm^2)	7.36	1.98	1.89	1.95	T= 19.64	0.000

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

Tabla 4. Matriz de correlación de las variables morfométricas en condición normal. Contempla los coeficientes de correlación de Pearson con el p de probabilidad asociada, siendo significativas las señaladas en rojo ($p < 0.05$).

2.2 Análisis de Correlación de Pearson

Las siguientes tablas de correlación representan las relaciones de las variables morfométricas en condición normal (Tabla 4) y condición alterada (Tabla 5); los coeficientes varían entre -1 y 1, siendo positivas aquellas que mantienen una relación proporcional y negativas las que describen una relación inversamente proporcional entre ellas. La cercanía a 1 establece mejor relación o mayor fuerza de correlación entre las mismas. Con un 95% de confianza, se establecen las correlaciones significativas para aquellas cuyo valor de p sea menor a 0,05 señaladas en asterisco.

AMBm	AMBfm	EI	%A	Am	DMm	BZ	Dens Mit	Endotelio	Diám cap	Dens Cav	Area Luz
AMBm	0.60* <i>p</i> =0.00	0.79* <i>p</i> =0.00	0.87* <i>p</i> =0.00	0.43* <i>p</i> =0.00	-0.09 <i>p</i> =0.3	0.29* <i>p</i> =0.00	-0.02 <i>p</i> =0.8	0.77* <i>p</i> =0.00	-0.80* <i>p</i> =0.00	-0.54* <i>p</i> =0.00	-0.70* <i>p</i> =0.00
	AMBfm	0.78* <i>p</i> =0.00	0.55* <i>p</i> =0.00	0.19 <i>p</i> =0.05	-0.04 <i>p</i> =0.6	0.16 <i>p</i> =0.1	0.02 <i>p</i> =0.8	0.61* <i>p</i> =0.00	-0.59* <i>p</i> =0.00	-0.31* <i>p</i> =0.00	-0.38* <i>p</i> =0.00
		EI	0.73* <i>p</i> =0.00	0.35* <i>p</i> =0.00	0.007 <i>p</i> =0.9	0.20* <i>p</i> =0.04	0.05 <i>p</i> =0.6	0.74* <i>p</i> =0.00	-0.74* <i>p</i> =0.00	-0.43* <i>p</i> =0.00	-0.64* <i>p</i> =0.00
			%A	0.30* <i>p</i> =0.00	-0.10 <i>p</i> =0.2	0.35* <i>p</i> =0.00	-0.05 <i>p</i> =0.6	0.80* <i>p</i> =0.00	-0.80* <i>p</i> =0.00	-0.53* <i>p</i> =0.00	-0.69* <i>p</i> =0.00
				Am	0.04 <i>p</i> =0.6	-0.002 <i>p</i> =0.9	-0.33* <i>p</i> =0.00	0.24* <i>p</i> =0.01	-0.32* <i>p</i> =0.00	-0.27* <i>p</i> =0.00	-0.32* <i>p</i> =0.00
					DMm	-0.06 <i>p</i> =0.5	-0.10 <i>p</i> =0.3	-0.09 <i>p</i> =0.4	0.04 <i>p</i> =0.6	0.005 <i>p</i> =0.9	0.02 <i>p</i> =0.8
						BZ	0.09 <i>p</i> =0.4	0.22* <i>p</i> =0.02	-0.19* <i>p</i> =0.04	-0.22* <i>p</i> =0.02	-0.33* <i>p</i> =0.00
							Dens mit	-0.05 <i>p</i> =0.6	0.04 <i>p</i> =0.7	-0.19 <i>p</i> =0.05	0.11 <i>p</i> =0.2
								Endotelio	-0.79* <i>p</i> =0.00	-0.48* <i>p</i> =0.00	-0.65* <i>p</i> =0.00
									Diám cap	0.38* <i>p</i> =0.00	0.73* <i>p</i> =0.00
										Dens cav	0.45* <i>p</i> =0.00
											Area Luz

*AMBm: Ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: Ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: Espacios intermiofibrilares, %A: Porcentaje de atrofia, Am: Área mitocondrial, DMm: Diámetro mayor de la mitocondria, BZ: Ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: Diámetro capilar, Dens cav: Densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: Área de la luz capilar.

De igual manera se interpretan los coeficientes de correlación en el caso de las variables morfométricas en condición alterado. Exhibiendo significancia estadísticas aquellas cuyo valor de *p* se encuentren por debajo de 0,05.

Tabla 5. Matriz de correlación de las variables morfométricas en condición alterada (con ESP). Contempla los coeficientes de correlación con su p de probabilidad asociada; siendo las significativas las señaladas en rojo ($p < 0.05$).

AMBm	AMBfm	EI	%A	Am	DMm	BZ	Dens Mit	Endotelio	Diám cap	Dens Cav	Area Luz
AMBm	0.20* $p=0.03$	0.10 $p=0.3$	0.48* $p=0.00$	0.03 $p=0.7$	-0.11 $p=0.25$	0.17 $p=0.07$	0.17 $p=0.08$	0.32* $p=0.00$	-0.38* $p=0.00$	-0.34* $p=0.00$	-0.42* $p=0.00$
	AMBfm	0.62* $p=0.00$	0.14 $p=0.1$	-0.01 $p=0.9$	0.14 $p=0.14$	0.13 $p=0.2$	-0.006 $p=0.9$	0.40* $p=0.00$	-0.38* $p=0.00$	-0.32* $p=0.00$	-0.37* $p=0.00$
		EI	0.05 $p=0.05$	0.09 $p=0.4$	0.13 $p=0.2$	0.14 $p=0.13$	0.11 $p=0.2$	0.24* $p=0.01$	-0.46* $p=0.00$	-0.37* $p=0.00$	-0.58* $p=0.00$
			%A	-0.24* $p=0.01$	0.19* $p=0.05$	-0.11 $p=0.3$	0.13 $p=0.2$	0.05* $p=0.00$	-0.35* $p=0.00$	-0.45* $p=0.00$	-0.35* $p=0.00$
				Am	-0.22* $p=0.02$	0.12 $p=0.2$	0.14 $p=0.13$	0.08 $p=0.4$	-0.06 $p=0.54$	-0.02 $p=0.81$	0.07 $p=0.44$
					DMm	-0.04 $p=0.6$	0.23* $p=0.02$	0.19* $p=0.05$	0.006 $p=0.95$	-0.01 $p=0.9$	-0.11 $p=0.24$
						BZ	0.25* $p=0.01$	-0.24* $p=0.01$	-0.24* $p=0.01$	-0.21* $p=0.03$	-0.42* $p=0.00$
							Dens Mit	0.17 $p=0.08$	-0.29* $p=0.00$	-0.21* $p=0.03$	-0.31* $p=0.00$
								Endotelio	-0.39* $p=0.00$	-0.36* $p=0.00$	-0.24* $p=0.01$
									Diám cap	0.70* $p=0.00$	0.78* $p=0.00$
										Dens cav	0.62* $p=0.00$
											Area Luz

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

2.3 Análisis de Componentes Principales (ACP)

A través de una reducción dimensional en función de las variables morfométricas en el estudio, el siguiente ACP (figura 27 y 28) indica una segregación de objetos (muestras en cada condición) en dos grupos bien definidos correspondientes a las condiciones en estudio: control (Grupo A) y alterado (grupo B). Por tanto, las variables morfométricas como vectores del sistema, logran determinar la separación de ambas condiciones.

En el siguiente ACP, se explica el 80% de la varianza total de la muestra en los tres primeros ejes, además se describen los autovalores y porcentaje de varianza de cada eje en ambas condiciones (normal y alterado) (Tabla 6). Asimismo, en la tabla 7 se señalan los pesos correspondientes a las diferentes variables morfométricas explicadas en cada eje del análisis.

	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5
Autovalores	7.205	1.65	0.803	0.618	0.451
Porcentaje	60.04	13.752	6.692	5.15	3.761
Porcentaje acumulado	60.04	73.791	80.484	85.634	89.395

Las relaciones de las variables y la dispersión de puntos de la muestra en ambas condiciones se muestran de forma tridimensional con los tres primeros ejes principales del análisis en la figura 27.

Tabla 7. Cuadro resumen del peso de las variables morfométricas por eje de un Análisis de Componentes Principales en ambas condiciones.

	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5
AMBm (μm)	0.328	0.064	-0.085	0.081	-0.368
AMBfm (μm)	0.319	0.128	-0.005	-0.265	0.067
EI (μm)	0.339	0.032	-0.04	-0.118	0.286
%A	0.331	-0.036	0.134	-0.068	-0.467
Am (μm^2)	0.161	0.321	-0.866	0.109	0.047
DMm (μm)	0.169	0.507	0.32	-0.502	0.236
BZ (μm)	0.323	0.082	-0.013	0.075	0.427
Dens Mit ($\text{mit}/\mu\text{m}^2$)	0.148	0.477	0.34	0.762	0.03
Endotelio (μm)	0.326	0.087	0.025	-0.133	-0.497
Diám cap (μm)	-0.313	0.357	-0.011	-0.078	-0.103
Dens Cav ($\text{cav}/\mu\text{m}^2$)	-0.298	0.335	-0.031	-0.152	-0.094
Area Luz (μm^2)	-0.305	0.368	-0.055	-0.081	-0.228

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

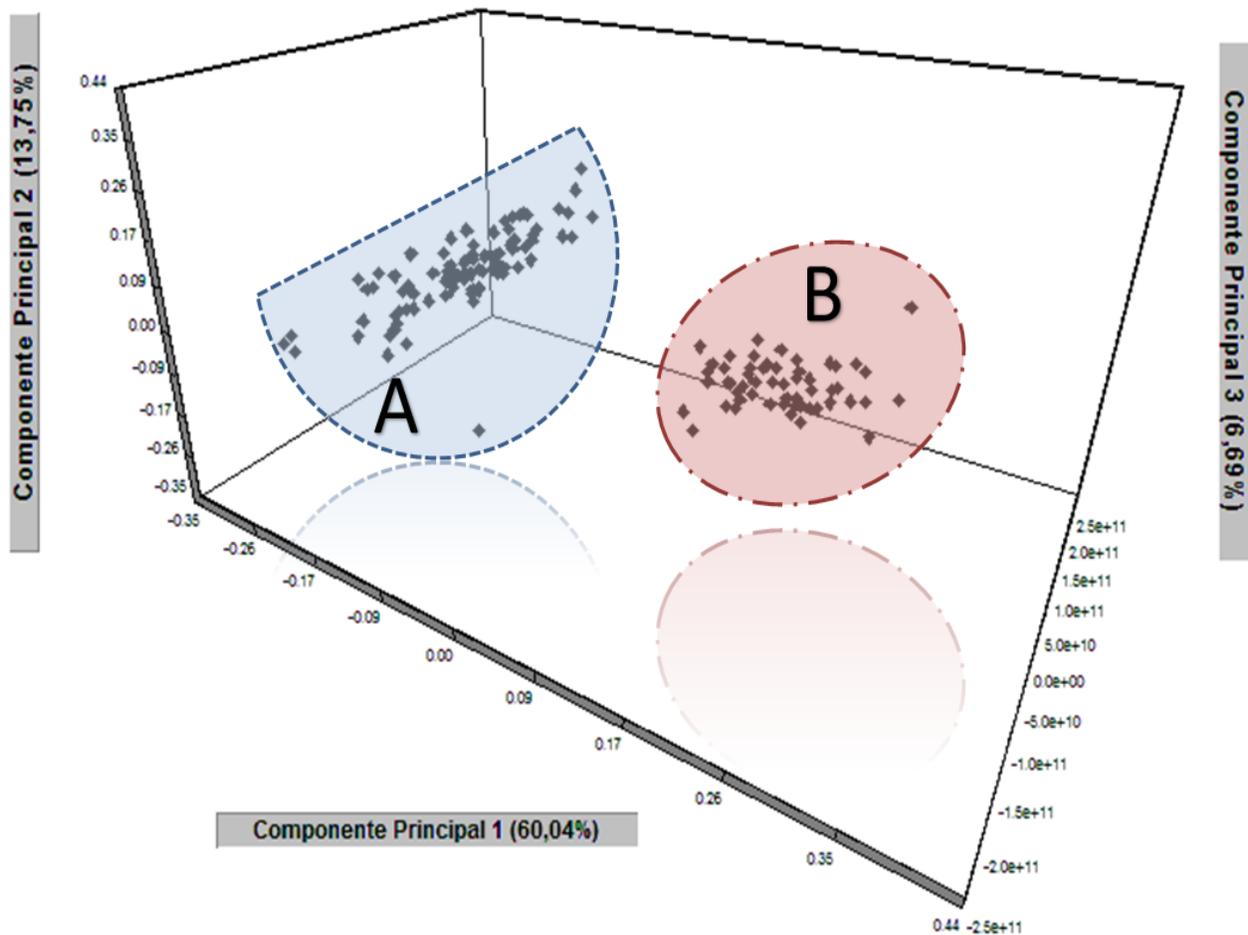


Figura 27. Representación gráfica tridimensional (componentes 1, 2 y 3) de un Análisis de Componentes Principales de las variables morfométricas en ambas condiciones. Se observa un grupo A perteneciente al grupo control y el grupo B representa los pacientes con ESP.

Sobre el mismo análisis, se realizó una representación gráfica con los dos primeros ejes principales, sobre el cual se explica el 73% de la varianza total del sistema (Figura 28).

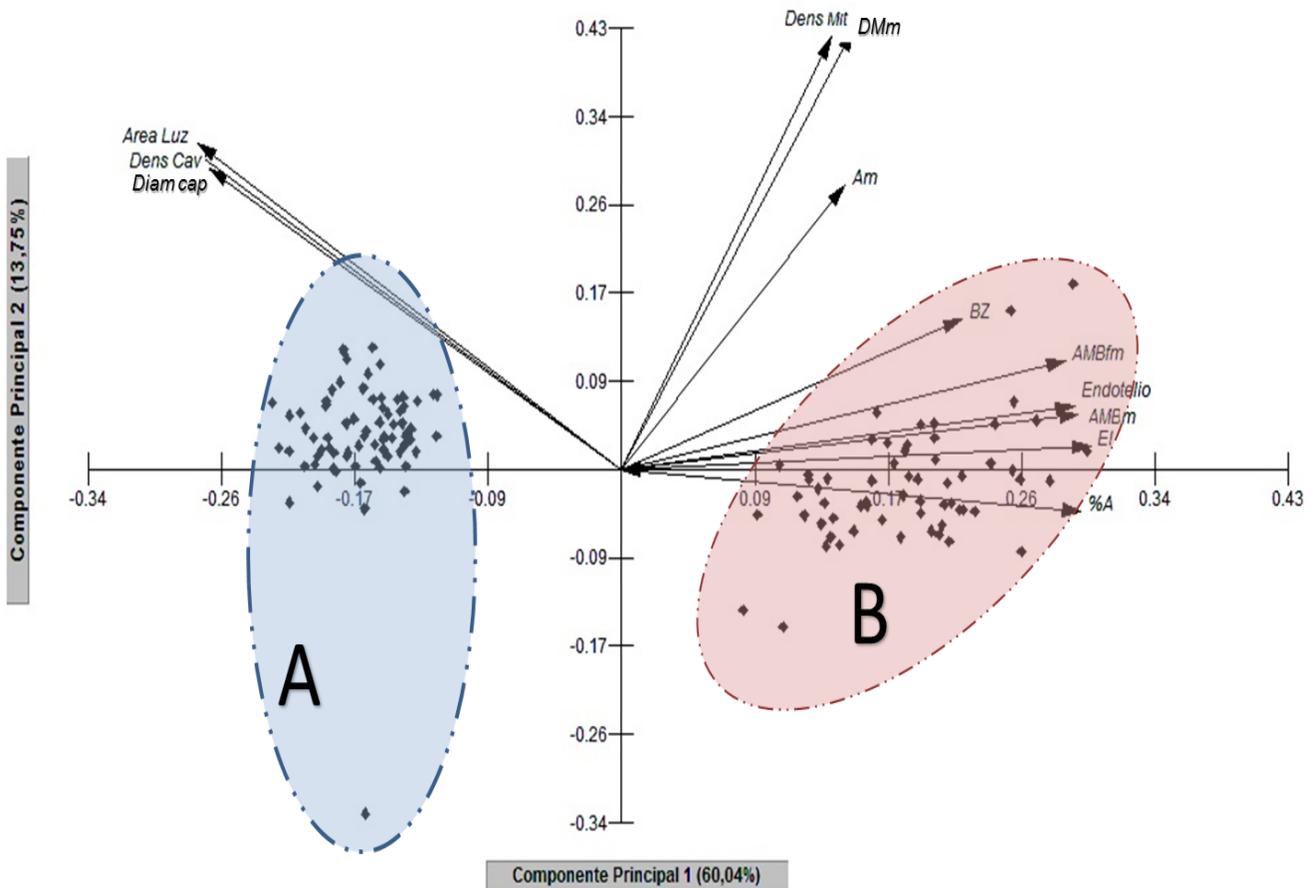


Figura 28. Representación gráfica de un Análisis de Componentes Principales (componente principal 1 y 2) de las variables morfológicas en ambas condiciones. Se observa un grupo A perteneciente al control; el grupo B representa los pacientes con ESP.

Ambos gráficos correspondientes a las figuras 27 y 28, representan la separación evidente de los grupos en estudio (normal y alterado) en función de todas las variables morfológicas consideradas a partir de las alteraciones descritas y observadas a nivel ultraestructural en músculo esquelético.

Posteriormente, se realiza un ACP para la condición normal en función de las variables morfométricas a fin de observar las posibles relaciones e interacciones de éstas sobre los objetos en dicha condición.

Dicho esto, se muestra en la tabla 8, el ACP correspondiente al grupo control; sobre el cual los componentes 1 y 2 explican el 60% de la varianza total de acuerdo a los valores y variables estimadas; pudiendo tomar éstos como ejes principales en el gráfico de dispersión y generar una mejor visión de la relación entre los objetos (las medidas en cada condición) y sus descriptores (variables morfométricas), tal como se observa en la figura 28.

Tabla 8. Cuadro resumen del Análisis de Componentes Principales sobre las variables morfométricas calculadas y registradas en condición normal.					
	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5
Autovalores	5.853	1.398	0.984	0.96	0.825
Porcentaje	48.778	11.646	8.201	7.996	6.875
Porcentaje acumulado	48.778	60.424	68.625	76.621	83.496

La tabla 9 sin embargo, representa la correlación o peso de las variables con los diferentes ejes o componentes estimados. Siendo entre ellos mejor representados en el eje 1, las variables: AMBm, AMBfm, EI, %A, Am, BZ, Endotelio, Diám cap, Dens cav y área de la luz, en negritas.

Tabla 9. Cuadro resumen del peso de las variables morfométricas por eje de un Análisis de Componentes Principales en condición normal.

	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5
AMBm (μm)	0.384	-0.014	-0.038	0.007	-0.073
AMBfm (μm)	0.295	0.06	0.163	-0.398	0.242
EI (μm)	0.364	0.014	0.173	-0.217	0.088
%A	0.377	0.035	-0.087	0.059	0.039
Am (μm^2)	0.176	-0.526	-0.105	0.115	-0.497
DMm (μm)	-0.03	-0.304	0.858	0.315	0.217
BZ (μm)	0.143	0.312	-0.21	0.713	0.352
Dens Mit (mit/ μm^2)	-0.014	0.702	0.321	-0.11	-0.296
Endotelio (μm)	0.363	0.023	-0.019	-0.122	0.104
Diám cap (μm)	-0.366	0.041	0.002	0.121	-0.127
Dens Cav (cav/ μm^2)	-0.25	-0.175	-0.186	-0.269	0.625
Area Luz (μm^2)	-0.332	0.056	0.072	-0.239	-0.063

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

Las relaciones e interacciones entre variables se observan como vectores en un gráfico de dispersión de puntos sobre la condición normal (Figura 29). En ella se describe una dispersión homogénea de los objetos cercanos al punto de origen del eje cartesiano.

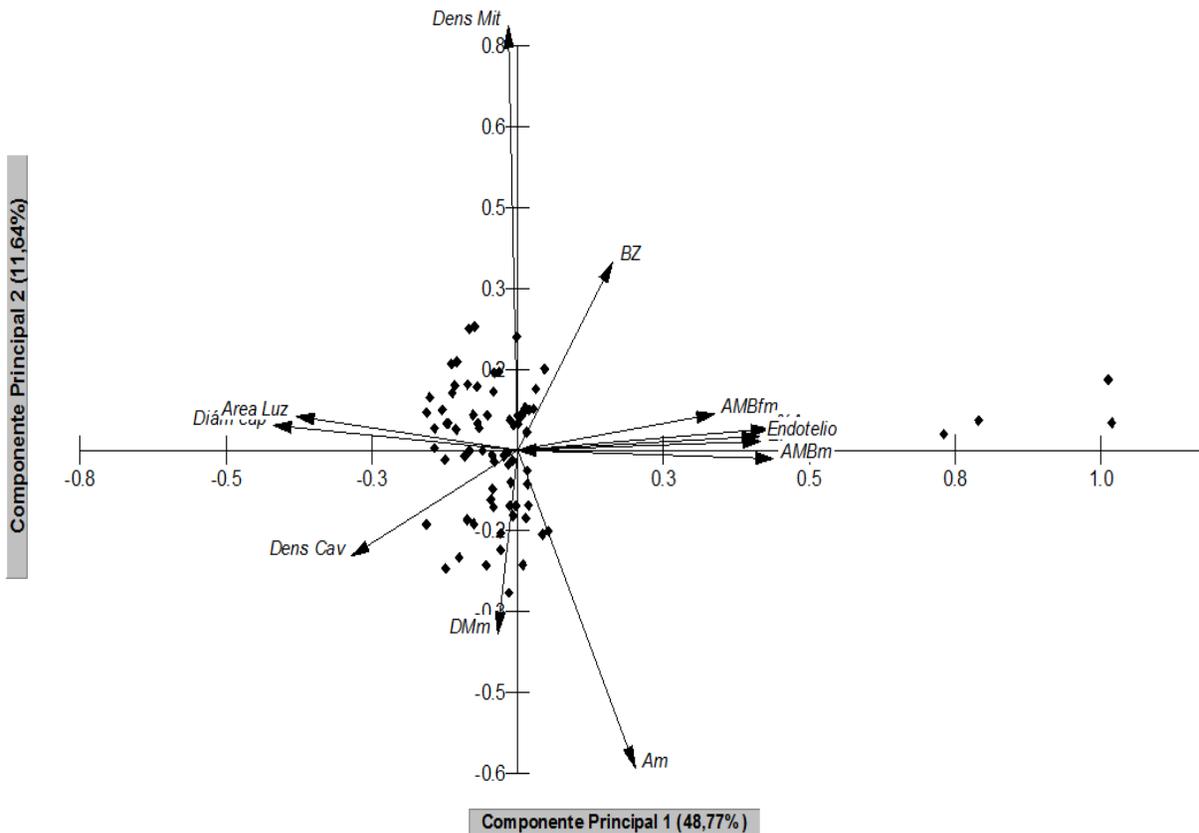


Figura 29. Representación gráfica de un Análisis de Componentes Principales (componentes 1 y 2) de las variables morfológicas en condición normal.

De igual manera, se realizó un ACP para la condición alterada sobre el cual los dos primeros componentes explican aproximadamente el 48% de la variabilidad total del sistema (tabla 10).

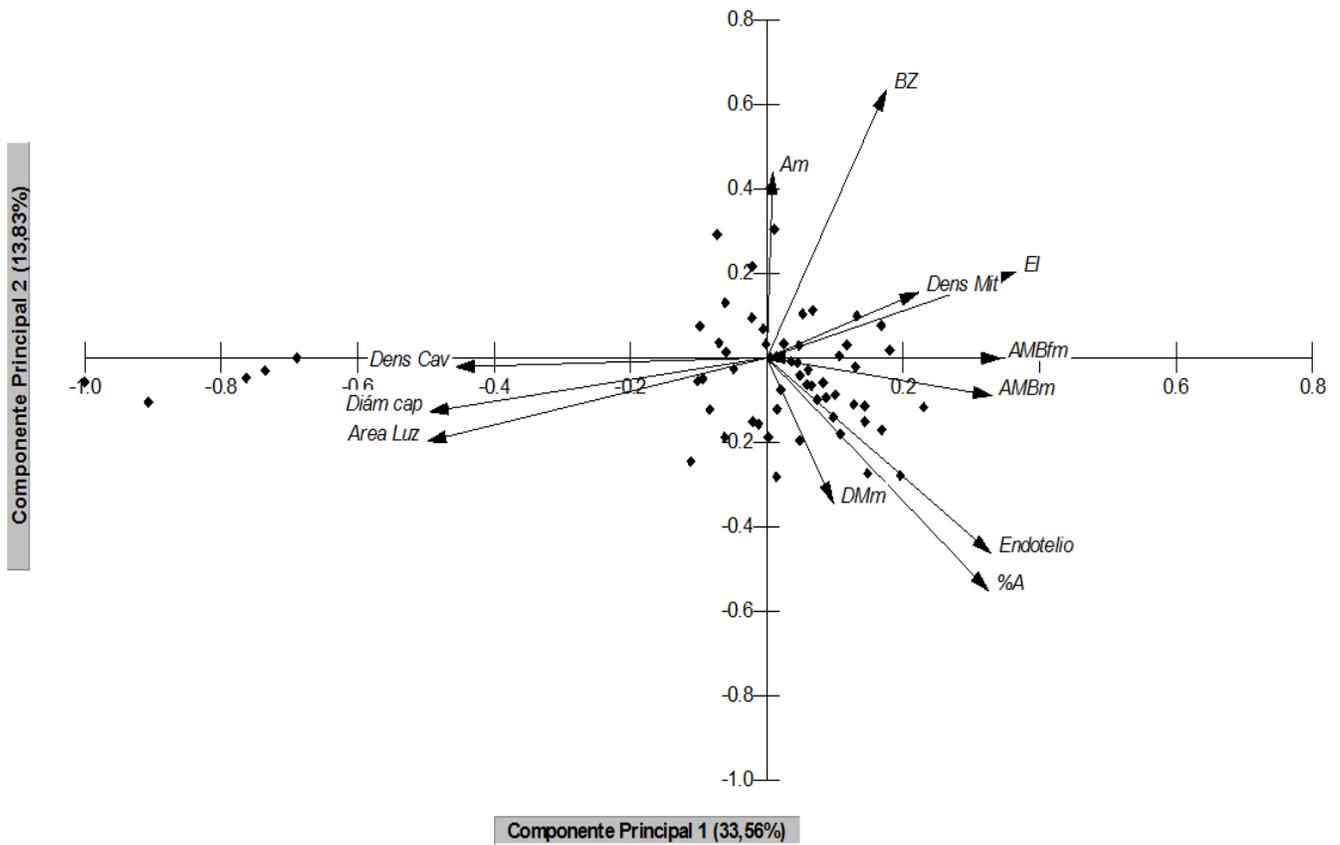
Tabla 10. Cuadro resumen del Análisis de Componentes Principales sobre las variables morfológicas calculadas y registradas en condición alterada (pacientes con ESP).

	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5
Autovalores	4.028	1.66	1.334	1.218	1.099
Porcentaje	33.569	13.836	11.114	10.146	9.156
Porcentaje acumulado	33.569	47.405	58.519	68.665	77.821

Tabla 11. Cuadro resumen del peso de las variables morfométricas por eje de un Análisis de Componentes Principales en condición alterada (pacientes con ESP)					
	Eje 1	Eje2	Eje 3	Eje 4	Eje 5
AMBm (μm)	0.282	-0.077	0.443	-0.145	0.084
AMBfm (μm)	0.293	-0.001	-0.493	-0.232	0.062
EI (μm)	0.313	0.174	-0.505	-0.124	0.011
%A	0.279	-0.473	0.293	0.055	0.08
Am (μm^2)	0.007	0.376	0.098	-0.399	-0.631
DMm (μm)	0.084	-0.295	-0.371	0.578	-0.256
BZ (μm)	0.15	0.544	0.111	0.312	0.156
Dens Mit ($\text{mit}/\mu\text{m}^2$)	0.191	0.133	0.195	0.461	-0.548
Endotelio (μm)	0.282	-0.397	-0.039	-0.263	-0.379
Diám cap (μm)	-0.423	-0.109	-0.072	0.052	-0.057
Dens Cav ($\text{cav}/\mu\text{m}^2$)	-0.391	-0.019	-0.128	0.057	-0.098
Area Luz (μm^2)	-0.426	-0.17	-0.005	-0.166	-0.196

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

Por otra parte, la tabla 11 corresponde al peso de cada variable morfométrica y su representación en cada eje; en ese sentido, todas las variables se encuentran representadas en el componente 1 a excepción del área y el diámetro mayor de la mitocondria.



Las relaciones de cada variable con las muestras se encuentran representadas en la figura 30. En ella además se exhibe una distribución heterogénea de puntos y vectores (variables) sobre los ejes 1 y 2, correspondientes a los componentes principales.

Figura 30. Representación gráfica de un Análisis de Componentes Principales (Componentes 1 y 2) de las variables morfométricas en condición alterada (en pacientes con ESP).

2.4 Regresión Logística Simple (RLS) y Regresión Logística Múltiple (RLoM)

La Regresión logística es una técnica de regresión que permite observar relaciones entre las variables morfométricas analizadas y la condición: sano-enfermo. Lo que permite identificar los cambios que exhiben las variables en presencia de la enfermedad. El estimador (β_0) representa la relación de las variables con la condición, por tanto, un β positivo, sostiene una correlación positiva entre la variable y la presencia de la enfermedad; lo mismo ocurre para estimadores negativos, en el cual la relación es negativa y la variable es menor en presencia de la enfermedad.

En ese sentido, se realizó una Regresión Logística Simple (RLS), a fin de evaluar el comportamiento de cada variable morfométrica sobre la presencia de la enfermedad (Tabla 12), exhibiendo todas éstas significancia estadística en tal condición. De este modo las variables descritas en la tabla 12 (morfométricas) se explican en presencia de la Esclerosis Sistémica; esto en función del valor determinado de los estimadores de cada variable (B_0), los cuales indican por su valor positivo, incremento en presencia de la enfermedad, y negativo decremento en dicha condición.

<p>Tabla 12. Regresión logística simple de cada variable morfométrica. Se presenta el valor del estimado (B_0), Error estándar (E.S), los Odd ratio (O.R), índice de la prueba de Wald con el p de significancia asociado.</p>

Variables	AMBm	AMBfm	EI	AM	DMm	BZ	Dens Mit	Endotelio	Diam Cap	Dens Cave	Area Luz	%A
Estimador (B0)	25.48	21.7	17.9	11.27	5.64	19.8	0.97	8.29	-2.23	-0.07	-0.81	0.08
E.S	3.19	3.04	2.39	2.76	1.07	2.79	0.27	1.18	0.25	0.01	0.09	0.01
O.R.	1x10 ¹¹	3x10 ⁹	6,5x10 ⁷	7x10 ⁴	282.7	4x10 ⁸	2.6	4x10 ³	0.10	0.9	0.4	1.0
Wald	63.7	51.2	56.3	16.5	27.4	50.4	12.5	48.7	77.6	57.4	68.9	52.9
p	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

Seguidamente, la regresión logística múltiple (RLoM) describe la influencia de las variables: porcentaje de atrofia (%A), diámetro mayor de la mitocondria (DMm), el grosor de la línea Z (BZ) y área de la luz capilar (Área luz) como determinantes estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la presencia de la enfermedad. Igualmente, es más probable el aumento de estas variables en pacientes con ESP que en condición normal (Tabla 13).

Tabla 13. Regresión logística múltiple de las variables morfométricas. En ella se describen: el valor del estimador (Bo) con su error estándar (E.S); los Odd ratio (OR) y el índice de la prueba de Wald con el p de significancia asociado.

Variables	AMBm	AMBfm	EI	%A	Am	DMm	BZ	Dens Mit	Endotelio	Diám cap	Dens Cav	Area Luz
Estimador (Bo)	-3.78	-2.73	6.77	0.05	5.07	6.25	20.11	-1.26	3.57	-1.82	-0.02	0.96
E.S	5.47	7.47	6.98	0.02	6.67	2.64	8.46	0.84	2.77	1.12	0.02	0.45
O.R.	0.02	0.07	869.6	1.05	159.3	520.51	5.4x10 ⁸	0.28	35.48	0.16	0.98	2.6
Wald	0.48	0.13	0.94	11.63	0.58	5.61	5.65	2.22	1.6	2.61	1.78	4.5
p	0.49	0.71	0.33	0.00*	0.45	0.02*	0.02*	0.14	0.2	0.11	0.18	0.03*

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de

la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

2.5 Regresión Lineal Múltiple (RLM)

A fin de evaluar las relaciones existentes entre las variables morfométricas tanto en condición normal como en alterada, se realizó una Regresión Lineal Múltiple en el que las variables dependientes son las que resultaron significativas en la tabla 13: porcentaje de atrofia (%A), el diámetro mayor de la mitocondria (DMm), el grosor de la línea Z (BZ) y el área de la luz capilar (área luz). Tales variables se seleccionaron de acuerdo a lo descrito en la RLoM, las cuales se explican de forma significativa en el sistema con la enfermedad.

Asimismo, tras un análisis de RLM en caso control, los coeficientes de correlación parcial estandarizados obtenidos del porcentaje de atrofia con el resto de las variables morfométricas, señalan que ninguna exhibió correlación estadísticamente significativa, de modo que ninguna mantiene relación con el grado de atrofia en condición normal (Tabla 14).

Tabla 14. Coeficientes de correlación de la regresión lineal múltiple para evaluar las relaciones de las variables independientes (AMBm, AMBfm, EI, %A, Am, BZ, Dens mit, Endotelio, Diám cap, Dens cav y área luz) con el porcentaje de atrofia (%A) de los casos control (condición normal). Los coeficientes de correlación parcial estandarizados no indican correlación de las variables mencionadas con el grado de atrofia en fibra muscular ($p > 0,05$). Exhibe un $R^2 = 0.26$ con $p = 0.27$ (regresión no estadísticamente significativa).

	Coef. de correlación parcial estandarizado	Coef. Correlación parcial	<i>p</i>
AMBm	-0.43	-107.89	0.05
AMBfm	-0.08	-17.15	0.67

EI	0.38	76.03	0.12
Am	0.00	-0.31	0.99
DMm	-0.12	-14.28	0.25
BZ	-0.07	-26.08	0.54
Dens Mit	-0.04	-1.43	0.77
Endotelio	0.10	10.77	0.59
Diám cap	-0.04	-0.94	0.86
Dens Cav	0.01	0.01	0.95
Area Luz	-0.26	-2.24	0.15

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

Por otra parte, a fin de evaluar las correlaciones existentes de las variables morfométricas con el diámetro mayor de la mitocondria (DMm), se realizó también una RLM sobre el cual se obtuvo los coeficientes de correlación parcial y estandarizada de estas variables en condición normal, señaladas en la tabla 15. En ella se observa que ninguna de las variables mencionadas exhibe correlación estadísticamente significativa sobre el diámetro mayor mitocondrial.

Tabla 15. Coeficientes de correlación de la regresión lineal múltiple para evaluar las relaciones de las variables independientes (AMBm, AMBfm, EI, %A, Am, BZ, Dens mit, Endotelio, Diám cap, Dens cav y área luz) con el diámetro mayor de la mitocondria (DMm) de los casos control (condición normal). Los coeficientes de correlación parcial estandarizados no indican correlación de las variables mencionadas con el diámetro mayor de la mitocondria ($p > 0,05$). $R^2 = 0.08$ con $p = 0.72$ (regresión no estadísticamente significativa).

	Coef. de correlación parcial estandarizado	Coef. Correlación parcial	<i>p</i>
AMBm (μm)	-0.18	-0.38	0.47
AMBfm (μm)	-0.15	-0.30	0.38
EI (μm)	0.42	0.72	0.08
%A	-0.23	-0.0019	0.36
Am (μm^2)	-0.03	-0.072	0.81

DMm (μm)	0.0057	0.018	0.96
BZ (μm)	-0.18	-0.063	0.13
Dens Mit ($\text{mit}/\mu\text{m}^2$)	-0.17	-0.15	0.40
Endotelio (μm)	-0.16	-0.035	0.45
Diám cap (μm)	-0.16	-0.0008	0.23
Dens Cav ($\text{cav}/\mu\text{m}^2$)	0.042	0.0031	0.81

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

No obstante, al evaluar los coeficientes de correlación parcial estandarizados obtenidos de la regresión lineal múltiple del grosor de la línea Z en condición normal, se obtuvo que ésta mantiene correlación negativa estadísticamente significativa con el área de la luz capilar ($p < 0,05$) (Tabla 16).

Tabla 16. Coeficientes de correlación de la regresión lineal múltiple para evaluar las relaciones de las variables independientes (AMBm, AMBfm, EI, %A, Am, DMm, Dens mit, Endotelio, Diám cap, Dens cav y área luz) con el grosor de la línea Z (BZ) de los casos control (condición normal). El coeficiente de correlación parcial estandarizado indica que el grosor de la línea Z mantiene correlación negativa con el área de la luz capilar ($p < 0,05$). Exhibe un $R^2 = 0.08$ con $p = 0.04$.			
	Coef. de correlación parcial estandarizado	Coef. Correlación parcial	<i>p</i>
Area Luz	-0.34	-0.01	0.00

* Area luz: área de la luz capilar.

De forma gráfica, con un análisis de ruta, se describe la relación existente entre la variable área de la luz capilar con el grosor de la línea Z (figura 29); con ella se muestra la ecuación de la regresión lineal múltiple obtenida a partir del análisis.

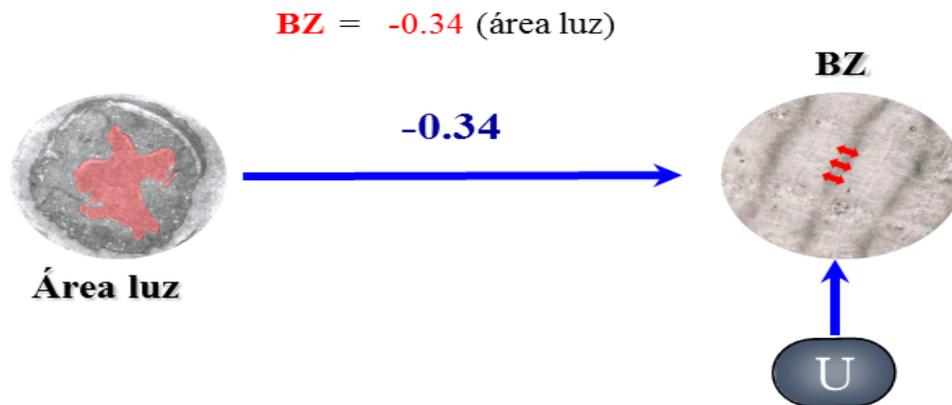


Figura 31. Análisis de ruta en el cual se observa la influencia de las variables independientes (morfométricas significativas) sobre el grosor de la línea Z en condición normal. La línea recta corresponde al coeficiente de correlación parcial estandarizado de la variable independiente (área luz) sobre la dependiente (grosor de la línea Z)

De igual manera, se realizó un análisis de RLM para la variable área de la luz capilar a fin de establecer las relaciones existentes con el resto de las variables morfométricas consideradas en el estudio; en él se obtuvo lo señalado en la Tabla 18.

Tabla 17. Coeficientes de correlación de la regresión lineal múltiple para evaluar las relaciones de las variables independientes (AMBm, AMBfm, EI, %A, Am, DMm, Dens mit, Endotelio, Diám cap, Dens cav y área luz) con el área de la luz capilar en caso control (condición normal). Los coeficientes de correlación parcial estandarizados indican que el área de la luz mantiene correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con las variables señaladas en rojo. Exhibe un $R^2 = 0.65$ con $p = 0.00$.

	Coef. de correlación parcial estandarizado	Coef. Correlación parcial	<i>p</i>
Diám cap	0.49	1.40	0.00
AMBm	-0.27	-7.64	0.02
BZ	-0.16	-7.10	0.02

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit:

Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

Tales relaciones descritas en la tabla 18, se establecen en un análisis de ruta (figura 32) sobre el cual, de forma gráfica se observa correlación positiva entre el área de la luz capilar con el diámetro capilar, pero exhibe correlación negativa con el ancho de la membrana basal de la microvasculatura y el grosor de la línea Z ($p < 0.05$).

$$\text{Área luz} = 0.49 (\text{Diám cap}) - 0.27 (\text{AMBm}) - 0.16 (\text{BZ})$$

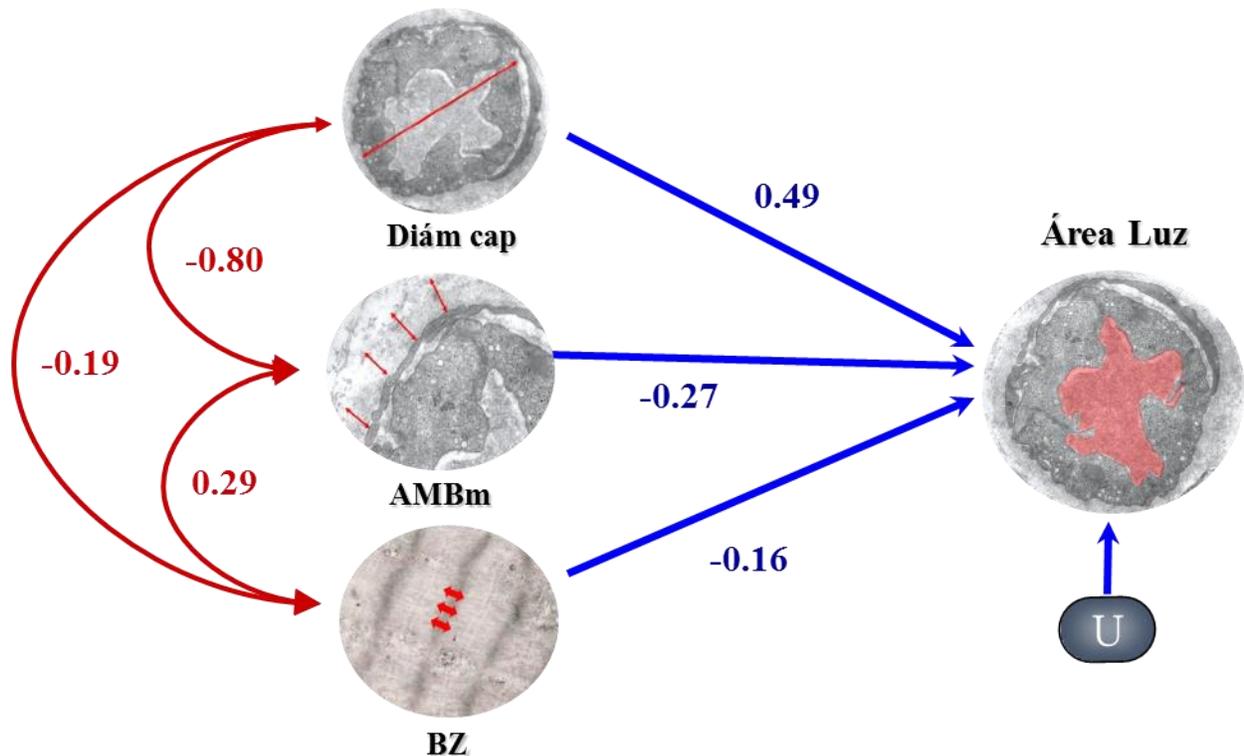


Figura 32. Análisis de ruta en el cual se observa la influencia de las variables independientes (morfométricas) sobre el área de la luz capilar (Área luz) en condición normal. Las líneas curvas corresponden al coeficiente de correlación de Pearson de las variables independientes, y las líneas rectas corresponden al coeficiente de correlación parcial estandarizado de las variables independientes sobre la dependiente (área de la luz capilar).

En el caso de pacientes con Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP), se realizó un análisis de RLM describiendo, en caso del porcentaje de atrofia (%A) como variable dependiente, correlaciones estadísticamente significativas con el grosor del endotelio capilar, el ancho de la membrana basal de la microvasculatura y el área mitocondrial de acuerdo con sus coeficientes de correlación parcial estandarizados indicados en la Tabla 18.

Tabla 18. Coeficientes de correlación de la regresión lineal múltiple para evaluar las relaciones de las variables independientes (AMBm, AMBfm, EI, %A, Am, DMm, Dens mit, Endotelio, Diám cap, Dens cav y área luz) con el porcentaje de atrofia en casos alterados (pacientes con ESP). Exhibe un $R^2=0.49$ con $p=0.00$.

	Coef. de correlación parcial estandarizado	Coef. Correlación parcial	<i>p</i>
Endotelio	0.41	32.67	0.00
AMBm	0.37	103.51	0.00
Am	-0.30	-135.90	0.00

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

Igualmente en la figura 33 se describe la ecuación de la RLM del porcentaje de atrofia en función de las variables significativas ($p<0.05$) descritas en la tabla 18. En ella se establecen relación de las variables: grosor del endotelio capilar y ancho de la membrana basal de la microvasculatura positivamente, y una correlación negativa con el área mitocondrial.

$$\% \text{ Atrofia} = 0.41 (\text{Endotelio}) + 0.37 (\text{AMBm}) - 0.30 (\text{Am})$$

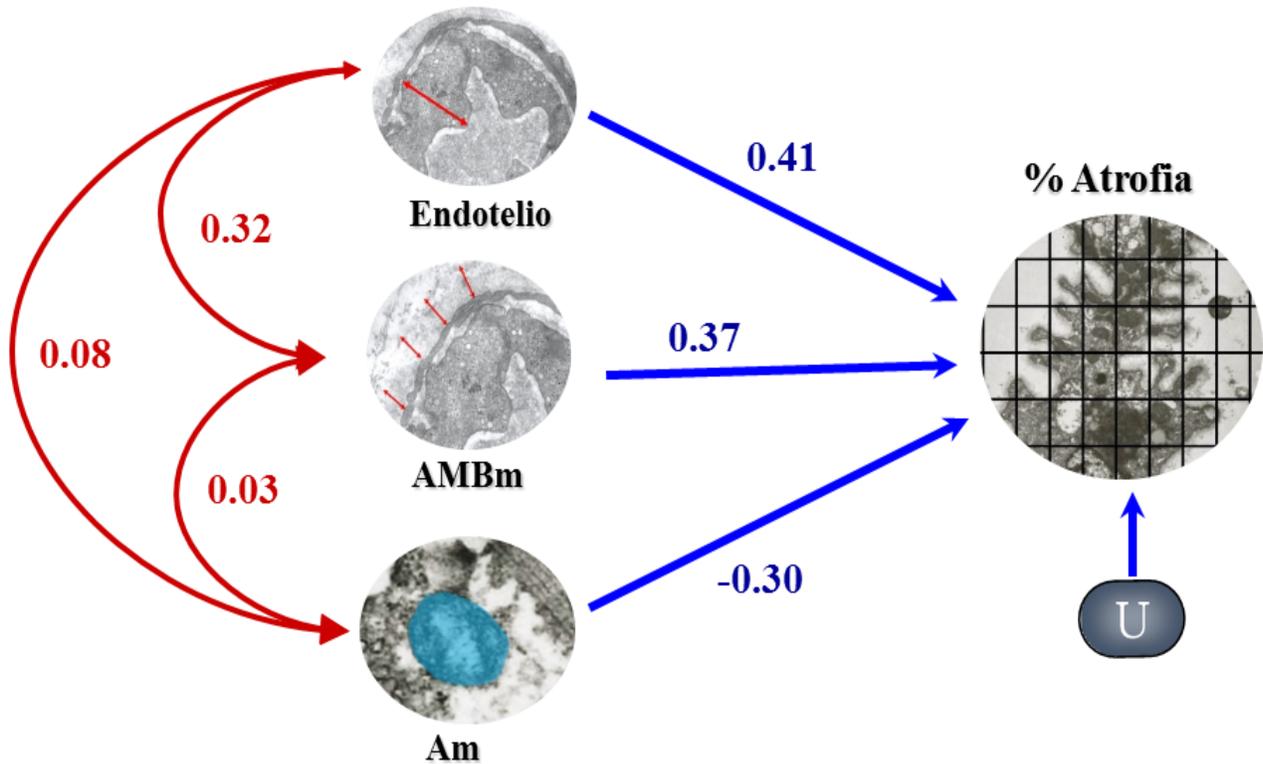


Figura 33. Análisis de ruta en el cual se observa la influencia de las variables independientes: grosor del endotelio capilar, ancho de la membrana basal de la microvasculatura y área mitocondrial sobre el porcentaje de atrofia en condición alterada. Las líneas curvas corresponden al coeficiente de correlación de Pearson de las variables independientes, y las líneas rectas corresponden al coeficiente de correlación parcial estandarizado de las variables independientes sobre la dependiente (porcentaje de atrofia).

Las correlaciones establecidas, corresponden a un incremento del porcentaje de atrofia cuando variables como grosor del endotelio y ancho de la membrana basal de la microvasculatura incrementan.

Posteriormente, se realizó un análisis de regresión para la variable diámetro mayor de la mitocondria (DMm), exhibiendo relaciones estadísticamente significativas con densidad de mitocondrias, área mitocondrial, grosor del endotelio y ancho de la membrana basal de la microvasculatura; tal como señala la tabla 19.

	Coef. de correlación parcial estandarizado	Coef. Correlación parcial	<i>p</i>
Dens Mit	0.27	0.07	0.01
Am	-0.28	-0.78	0.00
Endotelio	0.24	0.12	0.01
AMBm	-0.23	-0.40	0.02
*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.			

Asimismo, en la figura 34 se describe la ecuación de la RLM del diámetro mayor de la mitocondria en función de las variables morfométricas significativas ($p < 0.05$) establecidas en la tabla 19. En ella se describen la relación de las variables: densidad de mitocondrias, área mitocondrial, grosor del endotelio capilar y el ancho de la membrana basal de la microvasculatura con el diámetro mayor de la mitocondria.

$$DMm = 0.27 (\text{Dens mit}) - 0.28 (\text{Am}) + 0.24 (\text{Endotelio}) - 0.23 (\text{AMBm})$$

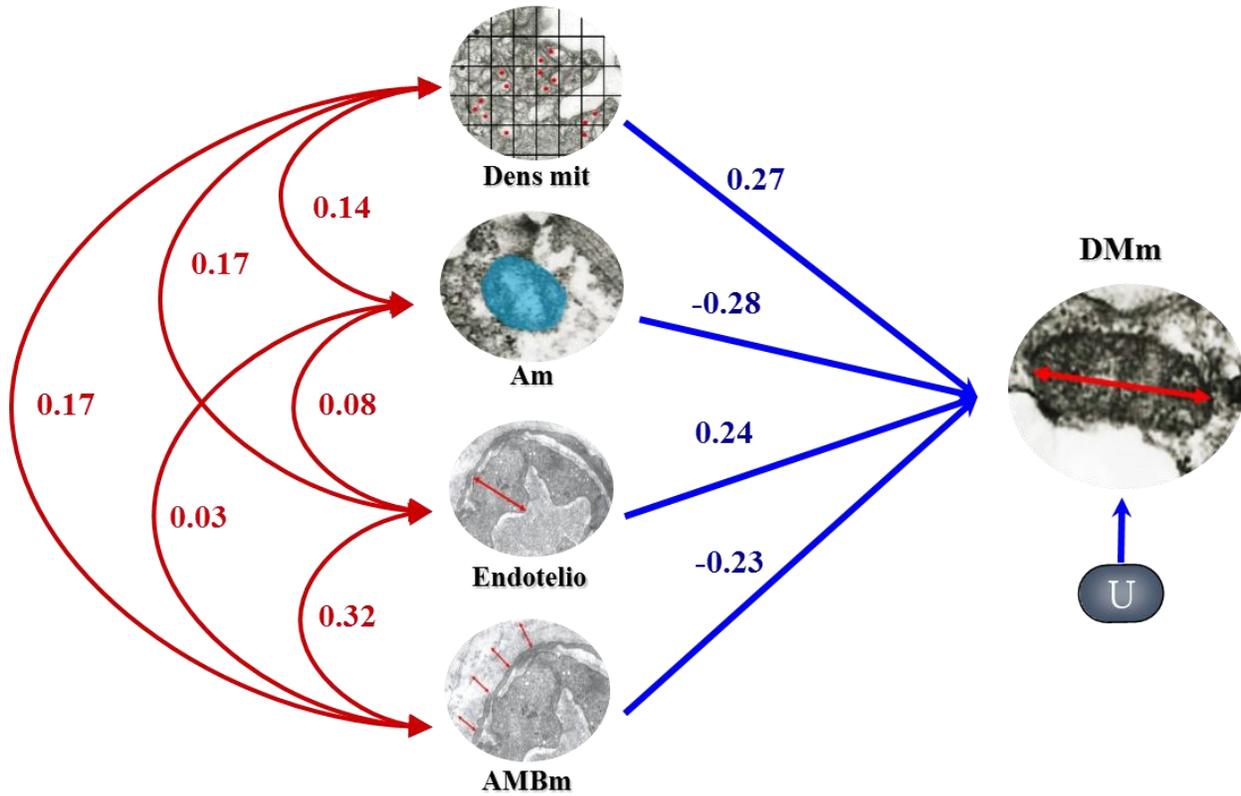


Figura 34. Análisis de ruta en el cual se observa la influencia de las variables independientes: densidad de mitocondria, área mitocondrial, grosor del endotelio capilar y ancho de la membrana basal de la microvasculatura sobre el diámetro mayor de la mitocondria en condición alterada. Las líneas curvas corresponden al coeficiente de correlación de Pearson de las variables independientes, y las líneas rectas corresponden al coeficiente de correlación parcial estandarizado de las variables independientes sobre la dependiente (diámetro mayor de la mitocondria).

Por otra parte, al evaluar la regresión lineal múltiple del grosor de la línea Z como función de las variables independientes (morfométricas) en caso alterado, se observan los siguientes coeficientes de correlación parcial estandarizados y su significancia estadística en la Tabla 20.

Los coeficientes de correlación parcial estandarizados (tabla 20) sugieren correlación

Tabla 20. Coeficientes de correlación de la regresión lineal múltiple para evaluar las relaciones de las variables independientes (AMBm, AMBfm, EI, %A, Am, DMm, Dens mit, Endotelio, Diám cap, Dens cav y área luz) con el grosor de la línea Z (BZ) de los casos alterados (pacientes con ESP). Exhibe un $R^2=0.32$ con $p=0.00$.

	Coef. correlación parcial estandarizado	Coef. correlación parcial	<i>p</i>
Area Luz	-0.54	-0.019	0.00
Endotelio	-0.38	-0.08	0.00
Am	0.20	0.24	0.01

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

negativa del grosor de la línea Z con el área de la luz y el endotelio capilar, mientras que conserva una correlación positiva con el área mitocondrial.

Las relaciones de estas variables señaladas en la tabla 20, las cuales mantienen correlación significativa con el grosor de la línea Z, están descritas en la ecuación de la regresión lineal múltiple estandarizada de la figura 35, la cual corresponde a una representación gráfica de las correlaciones entre ellas.

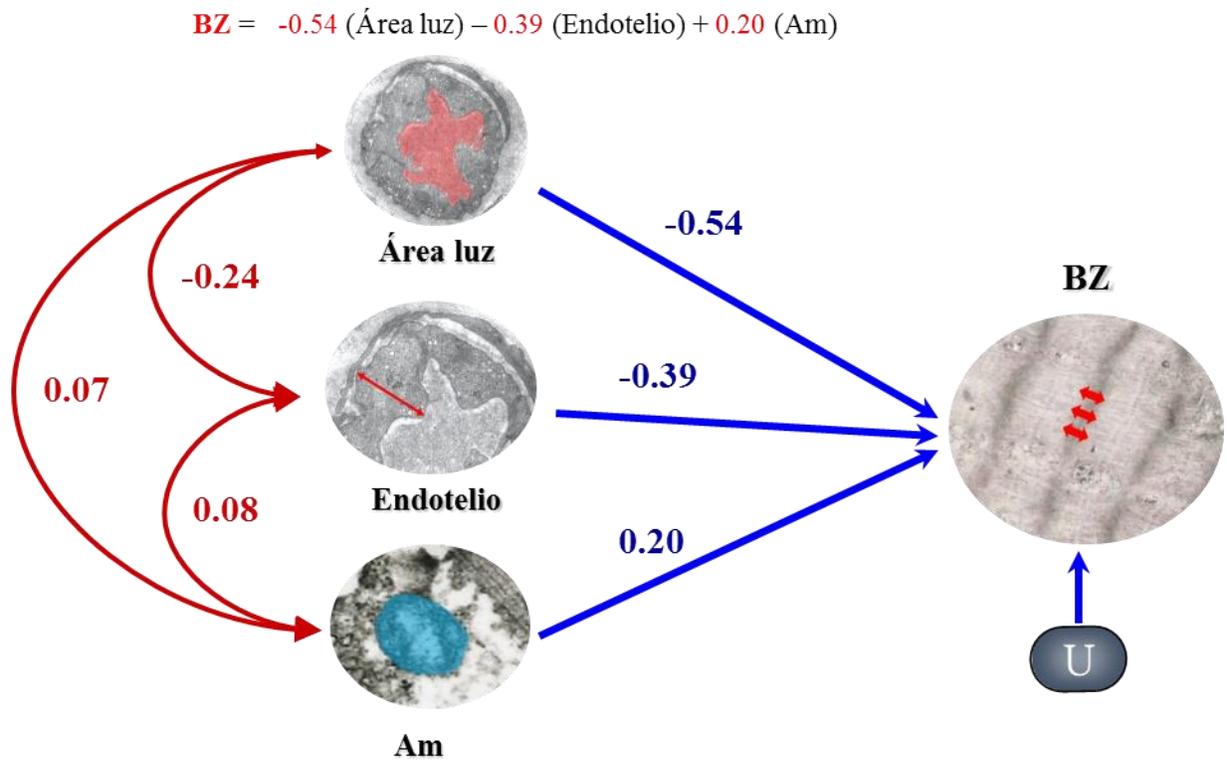


Figura 35. Análisis de ruta en el cual se observa la influencia de las variables independientes: área de la luz capilar, grosor del endotelio vascular y área mitocondrial sobre el grosor de la línea Z en condición alterada. Las líneas curvas corresponden al coeficiente de correlación de Pearson de las variables independientes, y las líneas rectas corresponden al coeficiente de correlación parcial estandarizado de las variables independientes sobre la dependiente (grosor de la línea Z).

Por último, a fin de evaluar las correlaciones existentes de las variables morfométricas con el área de la luz capilar en pacientes con ESP (alterado), se realizó una RLM en la cual se observan los siguientes coeficientes de correlación parcial estandarizados y su significancia estadística en la Tabla 21.

Tabla 21. Coeficientes de correlación de la regresión lineal múltiple para evaluar las relaciones de las variables independientes (AMBm, AMBfm, EI, %A, Am, DMm, Dens mit, Endotelio, Diám cap, Dens cav y área luz) con el área de la luz capilar en pacientes con ESP (condición alterada). Exhibe un $R^2=0.77$ con $p=0.00$.

	Coef. de correlación parcial estandarizado	Coef. Correlación parcial	<i>p</i>
Diám cap	0.60	1.85	0.00
BZ	-0.26	-7.14	0.00
EI	-0.28	-3.91	0.00
Am	0.17	5.67	0.00

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.

Tales coeficientes de correlaciones están representados en la ecuación de regresión lineal múltiple estandarizada de la figura 36, la cual corresponde al análisis de ruta del área de la luz capilar en función de las variables significativas señaladas en la tabla 21.

$$\text{Área luz} = -0.60 (\text{Diám cap}) - 0.26 (\text{BZ}) - 0.28 (\text{EI}) + 0.17 (\text{Am})$$

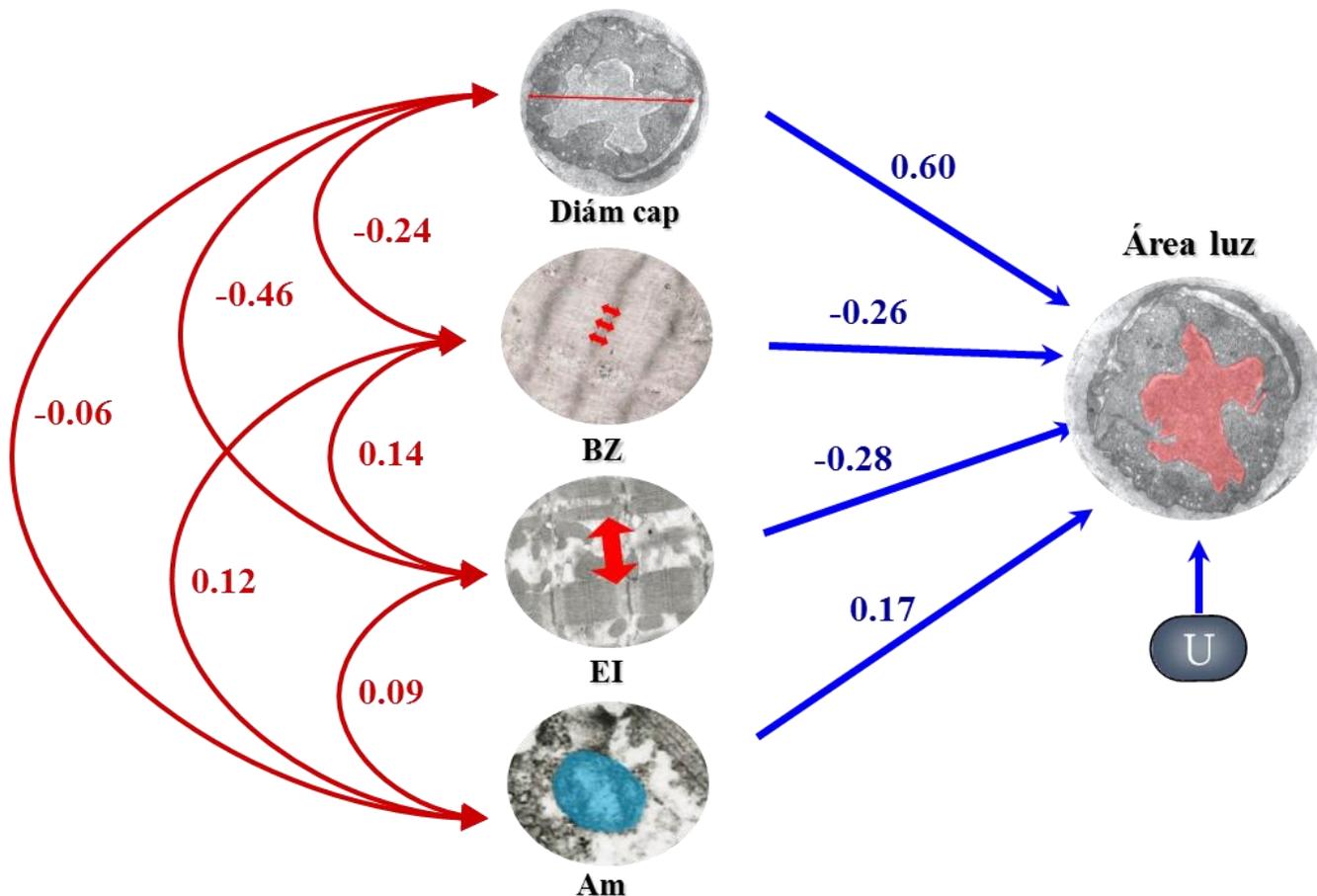


Figura 36. Análisis de ruta en el cual se observa la influencia de las variables independientes: diámetro capilar, grosor de línea Z, espacios intermiofibrilares y área mitocondrial sobre el área de la luz capilar en condición alterada. Las líneas curvas corresponden al coeficiente de correlación de Pearson de las variables independientes, y las líneas rectas corresponden al coeficiente de correlación parcial estandarizado de las variables independientes sobre la dependiente (área de la luz capilar).

DISCUSIÓN

Los estudios en morfometría han servido durante años para la resolución objetiva de problemas biológicos evaluados completamente desde una perspectiva cualitativa (Wied y col., 1989; Hamilton y Allen, 1995) siendo estos estudios algunas veces vulnerables a ambigüedades y sumergidos en subjetivismo al momento de establecer comparaciones entre diferentes condiciones.

A pesar de los avances en técnicas moleculares, los estudios morfológicos siguen y seguirán siendo una piedra angular en el diagnóstico y comprensión de la enfermedad. Por ello, el proceso de medición permitirá mejorar la interpretación de los cambios morfológicos y comprender en términos cuantitativos, la relación que puede existir entre el genotipo y fenotipo durante el transcurso de la enfermedad (Baak, 1987; Hamilton y Allen, 1995).

Durante un proceso patológico los componentes tisulares y celulares presentan múltiples variaciones que pueden ser cuantificadas. La determinación y caracterización de estos datos pueden ser en muchos casos esenciales para un diagnóstico, pero además, proporciona el panorama de un espectro de variaciones que permiten predecir la etapa o evolución de la enfermedad. Sin embargo, algunos de estos cambios son difíciles de detectar a simple vista, de allí la importancia del uso y aplicación de la morfometría en estudios histopatológicos

(Stahl, 1962; Collan, 1984; Rohlf, 1990; Reyment, 2010 Kayser y col., 2012). En ese sentido, la morfometría es una herramienta útil para la determinación de múltiples parámetros estructurales y para la deducción de la funcionabilidad de un grupo celular (True, 1996), además de la objetividad y reproducibilidad de los datos.

Se ha realizado una gran cantidad de estudios morfométricos en evaluaciones histológicas de múltiples tejidos y células en diferentes procesos tanto biológicos como patológicos (Dunnill, 1962; Weibel y Knight, 1964; Gil y Deligdisch, 1989). En el caso de las miopatías inflamatorias la principal afectación de este grupo de enfermedades es el daño celular en el tejido muscular esquelético, las cuales pueden llegar a exhibir alteraciones en común (Jerusalem y col., 1974; Hilton-Jones, 2003; Dalakas, 2011). Entre las enfermedades que constituyen este grupo de miopatías, los pacientes con Esclerosis Sistémica Progresiva han manifestado un conjunto de lesiones cuyo origen está estrechamente relacionado a los daños vasculares e inmunológicos principalmente (Batista y col. 2014). Dicho esto, el grupo de variaciones estructurales seleccionadas para el siguiente estudio, están asociadas a dos grupos celulares bien definidos dentro del músculo esquelético: la fibra muscular y el tejido microvascular asociado. Asimismo, la discusión de los resultados estará comprendida entre la descripción y la correlación de las variaciones morfométricas medidas en la ultraestructura de ambos componentes de la fibra muscular esquelética; para ello, igualmente consta de dos secciones (descriptiva y cuantitativa) que será debatida de forma compartida a lo largo de la discusión.

- **Análisis cualitativo de las alteraciones musculoesqueléticas en pacientes con ESP**

En cuanto a las alteraciones descritas en la fibra muscular respecto a su condición normal (Figura 12), se observaron diferentes grados de atrofia que comprenden desde la desorganización del sistema contráctil (Figura 19, 22 y 25) hasta la disminución del diámetro de la fibra (Figura 17); no obstante, algunas de ellas exhiben amplios espacios subsarcolémicos e intermiofibrilares (Figura 15, 16, 17, 18 y 20) correspondientes al grado de desorganización de las miofibrillas. Al reducirse y desorganizarse las miofibrillas del sistema contráctil, se generan espacios entre ellas y por lo general, la fibra disminuye su diámetro ocasionando plegamientos del sarcolema (Figura 14, 15, 18 y 20).

Parte importante de la región contigua interna al sarcolema (región subsarcolémica), es ocupada e invadida por gran cantidad de mitocondrias (Figura 16). Esta acumulación o deposición de éstas, tanto en la región intermiofibrilar como subsarcolémica (Figura 17, 18, 20), es debida a la degeneración progresiva y atrofia de las fibras musculares. Éstas han sido descritas en miopatías mitocondriales y otras enfermedades vía apoptosis celular (Scelsi, 1992; Arismendi, 2009; D'Emilio y col., 2010), en las cuales también, algunas exhiben alteraciones en su estructura tomando formas redondeadas e hinchamientos graduales (figura 15, 20 y 25). Las lesiones mitocondriales, se presentan como errores particulares en su metabolismo, estrés oxidativo o procesos que conducen a muerte celular

que tienen lugar en varios desórdenes musculares (Scelsi, 1992; Sandri y col., 1998; Tews, 2005; D'Emilio y col., 2010). Algunas de los errores metabólicos son explicados por deficiencias en la actividad de la Citocromo-C Oxidasa (Scelsi, 1992), sugiriendo que muchas de estas alteraciones pueden ser consecuencia de una insuficiencia en la obtención de energía funcional para la fibra originando su disfunción y posterior atrofia. No obstante, su hinchamiento es evidencia clara de irregularidades en la homeóstasis celular y las posibles condiciones de hipoxia tras la disminución de nutrientes y concentración de oxígeno celular por daños vasculares (Arismendi, 2009); todas ellas han sido ampliamente descritas por múltiples causas o asociadas a muchas enfermedades (Trushina y McMurray, 2007; Arismendi, 2009; D'Emilio y col., 2010; Seyfried y Shelton, 2010).

Otra de las alteraciones importantes observadas en este estudio, es el engrosamiento de la membrana basal de la fibra muscular (figura 14, 15,16, 17 y 19) la cual ha sido descrita en otras enfermedades del grupo de miopatías como el Lupus Eritematoso Sistémico (Finol y col., 1990) sin embargo, no se describe ni explica el mecanismo u origen de esta alteración en la fibra muscular. No obstante, se reconoce su resistencia ante un proceso de reinervación y procesos regenerativos de la fibra sobre la cual están definidas sus funciones (Sanes y col., 1978; Sanes, 2003; Corona y Greising, 2016).

Por otra parte, el aumento del grosor de la línea Z con formas irregulares (Figura 19 y 22) también se ha observado en procesos de desregulación de calcio a causa de miopatías

congénitas, daños mecánicos, efecto patológico inducido por esteroides y en enfermedades del tipo reumático (Afifi y col., 1977; Briggs y col., 1995; Clarkson y Hubal, 2002; Zvaritch y col., 2009). En la actualidad se desconoce el origen de estas alteraciones y son particularmente poco descritas en enfermedades asociadas a miopatías inflamatorias; en ese sentido, se dificulta la formulación de una hipótesis referente a la formación de cuerpos y estructuras polimórficas y engrosadas de la línea Z.

También se ha observado la infiltración de células mononucleares como mastocito (figura 14) y macrófago (figura 19), ambos productos de una respuesta inmune ante un proceso inflamatorio y activación de células T y B (Sternberg, 1985). Algunos componentes del sistema sarcotubular también describen alteraciones como la presencia de tríadas prominentes (figura 14, 15,19 y 20) y hasta su vacuolización (figura 25). No obstante, muchas de estas variaciones en la fibra muscular, han sido descritas en otros tipos de enfermedades tales como la Artritis Reumatoidea (Finol y col., 1988), Lupus Eritematoso Sistémico (Finol y col., 1990), y otras miopatías como polimiositis y dermatomiositis (Dalakas, 2015; Jerusalem y col., 1974); por tanto, estas afectaciones no son propias ni patognomónicas de la Esclerosis Sistémica Progresiva.

Adicionalmente, de forma regular aparecen gránulos de lipofucsina de diferentes dimensiones (figuras 15, 17,20 y 26), los cuales están asociados al sistema de desecho y digestión celular (Brunk y Terma, 2002). No obstante, estos gránulos han sido observados y

bien descritos en otros tejidos como hepático, músculo cardíaco y estriado en casos normales (Finol y col., 1984); por tanto, ellos no pueden ser tomados como indicadores de daño o lesión celular, y en específico a una miopatía inflamatoria. Asimismo la presencia y acumulación de estos gránulos es debida a la imposibilidad celular de degradación o eliminación vía exocitosis (Esteves y col., 2011)

Las alteraciones descritas en los distintos componentes de la fibra muscular (sistema contráctil, sarcotubular y mitocondrias) dan prueba a la hipótesis de que no existe una lesión primaria específica de músculo esquelético en la Esclerosis, dado que sólo los estudios histológicos no tienen una interpretación inequívoca y pueden traer confusión con cualquier otra miopatía o enfermedades del tejido conectivo (Medsger y col., 1968). Pero, mediante el uso de técnicas morfométricas se puede definir el grado de atrofia, o algún otro parámetro celular, que pueda ser distintivo o comparativo entre este grupo de enfermedades. Tal como en su estudio, Walton y Adams (1950), pudieron establecer que el incremento de tejido conectivo a nivel intersticial, perivascular y perineural es más frecuente en Esclerosis que en Artritis Reumatoidea.

En la microvasculatura asociada a la fibra muscular esquelética (figuras 21-26), se describieron múltiples alteraciones respecto al capilar normal (figura 13), destacando el engrosamiento y reduplicación de la membrana basal (Figuras 21-24 y 26), engrosamiento del endotelio capilar (oclusión de la luz) (figuras 21, 22, 23 y 25) y una disminución con

distribución irregular de las cavéolas y vesículas pinocíticas (figuras 21-26); estas observaciones han sido bien descritas y son características en ESP (Sternberg, 1985). Tales lesiones causan activación de células endoteliales y alteraciones en la permeabilidad capilar, afectando de forma importante el transporte vascular (Yamamoto, 2011), lo cual justifica la disminución de cavéolas y vesículas pinocíticas. Este tipo de lesiones puede ser resultado de alteraciones directas o indirectas de los anticuerpos anti-células endoteliales (AECA), generando activación de expresión de moléculas de adhesión celular que afectan la unión de leucocitos y explicando la presencia de infiltrados mononucleares en la matriz extracelular (Figuras 14, 19 y 26), los cuales también ya han sido ampliamente descritos en esta enfermedad (Jerusalem y col., 1974; Finol y col., 1994; Gabrielli y col., 2009). En el caso de la Esclerosis en particular, el proceso de regeneración vascular (vasculogénesis) es defectuosa, por tanto la cantidad de factores de crecimiento producidos por un componente autoinmune además, induce proliferación de células de músculo liso vascular, fibroblastos y deposición excesiva de matriz extracelular (Kuwana y col., 2004); evento que además incrementa por procesos inflamatorios.

De esta forma, el engrosamiento de las células endoteliales, las laminaciones (reduplicación) de la membrana basal y la deposición de matriz extracelular, a pesar de ser característica en Esclerosis, tal como se menciona, están relacionadas con un proceso que involucra lesión recurrente de las células endoteliales tras su intento de repararse (vasculogénesis defectuosa) (Norton y col., 1968; Rusell y Hanna, 1983; Sternberg, 1985).

Algunos pericitos que se encuentran adosados a las células endoteliales de la pared capilar, también describen alteraciones como mitocondrias hinchadas (figura 22) y distribución irregular de cavéolas y vesículas pinocíticas (figura 23 y 26), variaciones que fueron descritas y observadas por Jerusalem y col. (1974) en enfermedades pertenecientes a miopatías inflamatorias, aunque muestran de forma diferencial alteraciones entre ellas. Particularmente, los pericitos tienen la facultad de diferenciarse en células de músculo liso vascular, fibroblastos y miofibroblastos (células contráctiles de músculo liso) teniendo cierta influencia en la proliferación de células endoteliales. Así, un incremento en el grosor de la pared vascular es causa de la proliferación de éstas, indicando que responden y actúan sobre la injuria producida por la Esclerosis. En consecuencia, su proliferación también contribuye con el incremento del grosor de la pared vascular (Gabrielli, 2009).

Es importante señalar que muchas de estas lesiones presentes en la microvasculatura han sido descritas y muy bien estudiadas en otras enfermedades (Pardo y col., 1972; Jerusalem, Engel y Gómez, 1974; Baum y Bigler, 2016), en el que se explican como posibles causas físicas y biológicas: una alteración de presión hidrostática, insuficiencia venosa y proceso inflamatorio crónico, esta última coincide con algunas manifestaciones clínicas presentes en pacientes con miopatías inflamatorias. Por otra parte, dentro de los mecanismos fisiológicos y moleculares, explican que tales lesiones se deben, entre las causas más

relevantes: a la presencia de factores de crecimiento y de células y proteínas asociadas al proceso inflamatorio (Baum y Bigler, 2016) característico de los pacientes con ESP.

Acerca de la patogénesis de la Esclerosis Sistémica Progresiva, existen múltiples hipótesis del daño original que desencadena el resto de las alteraciones vasculares y en la fibra. Sin embargo, es conocido que los daños inmunológicos y vasculares no son eventos o procesos excluyentes, ya que cada uno de ellos incorpora aspectos del otro en el ciclo de eventos de la enfermedad (Sternberg, 1985). En la actualidad, se reconocen algunas lesiones como tempranas o previas al conjunto clínico típico de pacientes con ESP las cuales además coinciden con las observadas en este estudio por imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET), entre ellas se describen: las alteraciones vasculares e inflamatorias acompañadas de un proceso fibrótico, seguidas de daños en células endoteliales, pericitos, fibroblastos con presencia de células mononucleares, incluyendo la presencia de múltiples citoquinas, factores de crecimiento y diversos autoanticuerpos que son producidos en respuesta a un mecanismo inmune de autorregulación y regeneración (Kuwana y col. 2004; Yamamoto, 2011). De igual manera, los aspectos más detallados acerca de la patogénesis de esta enfermedad aún no son claros (Gabrielli, 2009).

- **Análisis cuantitativo de las alteraciones musculoesqueléticas descritas en pacientes con Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP)**

La selección de los parámetros celulares que exhiben diferencias entre los pacientes con ESP y su condición control, constituye la primera etapa de este estudio y sobre el cual, a través de un análisis e interpretación de imágenes obtenidas por MET del tejido muscular esquelético, permiten determinar la importancia biológica y estructural que ellos tienen en presencia de la enfermedad. Razón por la cual, llevar estas descripciones de algunos parámetros celulares a términos numéricos es lo que constituye el principal aporte de esta investigación.

La obtención de datos cuantitativos exhibe una principal ventaja sobre la observación visual convencional, y ésta es poder establecer de forma objetiva y determinística comparaciones y relaciones entre las condiciones de estudios. No obstante, en este trabajo tales comparaciones permiten no sólo conocer las diferencias existentes en dos situaciones (sano y enfermo), sino establecer relaciones en escalas multidimensionales de un organismo, tejido o célula conociendo la dificultad que existe de estudiar e investigar la extensión y la naturaleza de todos los procesos biológicos adaptativos que ocurren en él.

La aplicación de morfometría y estadística multivariante está basada en uno de sus principios, en que todo sistema biológico constituye un sistema multifactorial en el que confluyen las interacciones de todas las variables naturales existentes en él (Sjöstrom y col., 1982). Además de estar en conocimiento de que toda función tiene una base estructural definida y una entropía natural compleja (Weibel, 1969; Hamilton y Allen, 1995). Por ello,

se propone la determinación de estimaciones cuantitativas como método complementario a otros tipos de estudios (bioquímico, genéticos, clínicos) que puedan mejorar la visión práctica en estudios clínicos de múltiples enfermedades e incluso ampliar esta visión con fines de integración para la comprensión de los procesos patológicos que ocurren durante la enfermedad (Sjöstrom y col., 1982; Baak, 1987, Hamilton y Allen, 1995).

De esta manera, tras el análisis descriptivo de las imágenes, los parámetros celulares (variables morfométricas) seleccionados y observados en las micrografías electrónicas de pacientes con ESP, se cuantificaron estimando parámetros estadísticos descriptivos como media aritmética y desviación estándar. A partir de estos datos, se establecen comparaciones respecto a la condición normal mediante un análisis de comparación de medias (Tabla 3): T-Student para aquellas variables que cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza (ANEXO) y U de Mann-Whitney para las que no.

El análisis estadístico de la tabla 3, mostró diferencias significativas de todas las variables morfométricas consideradas para el estudio, entre la condición normal y alterada, indicando el incremento de algunas variables y el decremento de otras en condición alterada (pacientes con ESP).

La determinación de valores numéricos de estos parámetros celulares, en ambas condiciones como sistemas independientes, permitió explorar detalladamente las relaciones e interacciones de estas variables morfométricas en condición normal y alterada. Esto, a fin de observar y establecer asociaciones de variables particulares que se mantengan en constante interacción en condiciones biológicamente naturales (control) y sus posibles cambios en presencia de la enfermedad (alterada). Para ello, se realizó un análisis de correlación la cual muestra correlaciones de variables que se establecen en la condición normal (Tabla 4) y alterada (Tabla 5).

La matriz de correlación de las variables morfométricas en condición normal (Tabla 4), conserva relaciones significativas de todas las variables morfométricas asociadas a la fibra muscular con las variables pertenecientes a la microvasculatura ($p < 0.05$); siendo de especial interés dado que tales relaciones sugieren que el estado de la fibra muscular está estrechamente vinculada con el estado de la microvasculatura asociada. Dicho esto, los cambios en el capilar pueden inducir también modificaciones en la fibra o viceversa tal como plantea Jerusalem, y col. (1974), existiendo la posibilidad de que los capilares musculares se degeneren o desaparezcan tras la necrosis o atrofia de la fibra muscular y que, también pueden regenerarse cuando las fibras están recuperadas o vuelven a su tamaño normal.

Asimismo, en esta matriz de caso control, existen correlaciones significativas entre todas las variables morfométricas asociadas a la fibra muscular ($p < 0.05$) con excepción del diámetro mayor de la mitocondrial (DMm) y la densidad mitocondrial (Dens mit). Sin embargo, son de especial importancia para el estudio señalar que entre las variables morfométricas propias de la fibra, mantienen correlación positiva los espacios intermiofibrilares (EI) con el porcentaje de atrofia (%A) y el área mitocondrial (Am) (Tabla 4), de forma que un aumento en el Am está relacionado con un incremento en los EI. Esto apoya la hipótesis de que la disfunción metabólica de las mitocondrias está asociadas a una desregulación osmótica que desfavorece la producción de energía en forma de ATP necesaria para el correcto funcionamiento de la fibra muscular, ocasionando indirectamente la inactividad de las miofibrillas y su posterior atrofia Scelsi, 1992; Sandri y col., 1998; Tews, 2005; D'Emilio y col., 2010).

En condición alterada (Tabla 5), entre las correlaciones significativas halladas entre las variables morfométricas de la fibra muscular, se mantienen exclusivamente la relación de los espacios intermiofibrilares (EI) con el ancho de la membrana basal de la fibra muscular (AMBfm) y el grosor de la línea Z (BZ) con la densidad mitocondrial en la fibra (Dens mit) ($p < 0.05$). Estas relaciones pueden estar vinculadas al componente autoinmune característico de la enfermedad, observándose replicación y engrosamiento de la membrana basal cuando el proceso degenerativo de la fibra muscular está en etapas avanzadas (via necrosis celular) o en posible regeneración entre las hipótesis sugeridas (Sanes y col., 1978;

Sanes, 2003; Corona y Greising, 2016). Por otra parte, la disfunción metabólica mitocondrial genera déficit energético que es de vital importancia en la funcionabilidad de este complejo celular, promoviendo la desorganización interna y problemas funcionales en la contracción; seguida de atrofia y posible muerte celular.

La principal diferencia observada en las correlaciones establecidas en ambas condiciones, es que disminuyen casi al 10% las correlaciones significativas en condición alterada (Tabla 5) respecto a la condición normal (Tabla 4). Esto admite rupturas y disociaciones entre las variables intrínsecas y características del sistema por la presencia de alteraciones a causa de la enfermedad, las cuales introducen mayor desorden o afecta de manera directa la entropía natural del sistema.

Igualmente, con la premisa de que un organismo es un sistema multifactorial en el que interactúan múltiples variables de forma simultánea, una de las ventajas de poder tratar tales variaciones en términos numéricos, es poder evaluar mediante un análisis estadístico, las interacciones de las variables implicadas en diferentes etapas de la enfermedad lo más cercano posible a la realidad biológica de este sistema que se encuentra en cambio. Dicho esto, a fin de corroborar las relaciones existentes entre las variables morfométricas en un sistema multidimensional donde confluyen todas estas interacciones, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP).

El ACP en ambas condiciones (Tabla 7) permitió discriminar en dos grupos muy bien definidos la condición normal (grupo A) del alterado (Grupo B) (Figura 27, 28 y 29) explicando entre el 70 y 80% de la varianza total del sistema, lo cual representa casi en su totalidad el comportamiento y la segregación de los objetos (medidas en ambas condiciones) en función de estas variables. Esto fortalece la importancia que poseen variables mesurables seleccionadas a partir de los parámetros celulares que se encuentran en cambio en la condición enferma. Esto coincide con lo observado y descrito en el análisis de comparación de medias de la Tabla 1, en el que se definen los cambios de la fibra muscular esquelética de pacientes con ESP respecto a la condición normal.

Asimismo, se corroboró las múltiples relaciones de las variables morfométricas en cada condición. En muestras control (normal), se explica alrededor del 60% de la variabilidad total del sistema sobre los componentes principales 1 y 2 (tabla 8), los cuales están representado en un *Biplot* en la figura 30. En esta figura se observa la concentración de los objetos (muestras medidas) en el centro del plano cartesiano con una distribución regular y homogénea. Sin embargo, la dirección y sentido de cada una de estas variables (vectores) permite reconocer las correlaciones que tienen entre ellas y sus componentes principales, representadas en la tabla 9 por la magnitud de sus autovalores. De forma ejemplificada, dadas las direcciones opuestas con mismo sentido de sus vectores, se observa la correlación

negativa existente entre el área de la luz capilar con el área mitocondrial; esto además coincide con lo establecido en los coeficientes de correlación determinados en la tabla 4.

También se realizó un ACP para la condición alterada (tabla 10) sobre el cual se explica en los dos primeros componentes principales alrededor del 50% de la variabilidad total del sistema, disminuyendo casi al 10% la variabilidad explicada en la condición normal. Esto sugiere un aumento de entropía o alteración de la entropía natural del sistema dado las rupturas de las correlaciones simples existentes entre las variables interactuantes del mismo (demostrado en la matriz de correlaciones de la tabla 5). Este fenómeno puede ocurrir a causa de la variación o perturbación de los objetos en presencia de la enfermedad, haciendo más difícil su explicación a través de un modelo estadístico multivariado, dado que la variación y el desorden aumentan por pérdida de relaciones entre variables respecto a la condición normal. Esto se encuentra representado en la figura 32, en la que se observa en *Biplot* los componentes principales 1 y 2, la distribución heterogénea y dispersa de los objetos en función de las mismas variables morfométricas de este estudio.

En relación a las variaciones y cambios discutidos de forma comparativa entre las condiciones de estudios; uno de los objetivos que este trabajo pretende, es poder observar, describir y analizar patrones de cambios en modelos multivariados a fin de esclarecer las relaciones e interacciones de variables que pueden ser determinantes en la condición enferma de los pacientes con ESP. En ese sentido, poder evaluar la importancia del cambio

de cada variable morfométrica sobre una condición control-alterado, es lo que representa una de las principales ventajas sobre el establecimiento de correlaciones simples señaladas anteriormente, en las cuales se correlacionan sólo variables continuas.

Dicho esto, una de las principales herramientas que permite describir la importancia de cada una de las variables morfométricas en una condición sano-enfermo es la Regresión Logística. En ese sentido, con el propósito de conocer la importancia o peso de cada variable morfométrica asociada a esta condición dicótoma (control-alterado), se realizó una Regresión Logística Simple (Tabla 12) la cual señaló significancia estadística de todas las variables del estudio en presencia de la enfermedad. En ella se interpreta el estimador (Bo) como un coeficiente de correlación positiva en condición alterada con todas las variables morfométricas asociadas a la fibra muscular esquelética, incluyendo el ancho de la membrana basal de la microvasculatura. Sin embargo, este mismo parámetro exhibe una correlación negativa con densidad de cavéolas y vesículas pinocíticas, área de la luz y diámetro capilar, lo implica una disminución de la magnitud de estas variables en presencia de la enfermedad. De esta manera, cada parámetro significativo en este modelo, sugiere una implicación biológica en el proceso patológico de los pacientes con ESP.

Tal como se ha discutido a lo largo del trabajo, la existencia de un sistema biológico que es multidimensional y que es producto de las posibles interacciones que existen entre sus variables, poder establecer e identificar cuáles de ellas (en interacción permanente) posee

mayor relevancia en un proceso patológico, es uno de los objetivos de este estudio. Es por ello, que a través de un análisis de Regresión Logística Múltiple (RLogM), se permitió seleccionar de entre todas las variables, las de importancia para explicar el proceso de transición entre la condición normal y alterada.

Así, la RLogM de las variables morfométricas consideradas para este estudio (Tabla 13) de acuerdo a los p de significancia asociados a la prueba de Wald ($p < 0,05$), permitió determinar como variables significativas del sistema (en presencia de la enfermedad): el porcentaje de atrofia (%A), el diámetro mayor de la mitocondria (DMm), el grosor de la línea Z (BZ) y el área de la luz capilar (Área luz), las cuales aumentan en magnitud y probabilidad de ocurrencia según lo descrito por el estimador (B0). Estas cuatro (4) variables son las que componen mayor peso y significancia en la enfermedad, por ello estudiar su comportamiento o variación en esta condición, constituye el próximo paso de estudio.

Una vez que la RLogM permitió identificar las variables significativas evaluando sus interacciones en el proceso de transición de la condición sano-enfermo; se intenta conocer las variaciones y comportamiento de estas cuatro (4) variables seleccionadas en las dos condiciones por separado. Esto a fin de establecer un modelo acerca del funcionamiento de estas variables descritas que han mostrado importancia biológica en la enfermedad.

Asimismo, tal evaluación permite poder definir el tipo y magnitud de interacción con el resto de las variables de estudio durante el proceso patológico.

De esta forma, se realizó una Regresión Lineal Múltiple (RLM) para cada una de las cuatro (4) variables morfométricas mencionadas, sobre las que se desea estudiar su comportamiento tanto en la condición normal como en condición alterada. Éstas variables: el porcentaje de atrofia (%A), el diámetro mayor de la mitocondria (DMm), el grosor de la línea Z (BZ) y el área de la luz capilar (Área luz), serán evaluadas en función del resto de las variables morfométricas en ambas condiciones.

Tras hacer el análisis de RLM en condición normal, las variables %A (Tabla 14) y DMm (Tabla 15) no presentaron una regresión estadísticamente significativa. Esto sugiere la ausencia o poca exhibición de fibras musculares atroficas en condición normal. De igual forma, el diámetro mayor de la mitocondria (DMm) no presenta significancia dentro de esta condición, debido al mantenimiento de su estructura y funcionabilidad regular aparente en la fibra muscular esquelética.

En esta misma condición, el grosor de la línea Z (BZ) y el área de la luz capilar (área luz), si exhiben Regresión Lineal Múltiple significativa ($p < 0.05$). En cuanto al grosor de la línea Z (Tabla 16), tiene correlación negativa con el área de la luz capilar. Tal relación puede observarse mediante una representación de análisis de ruta en la figura 31. Como bien se ha

descrito, existe y se mantienen relaciones estructurales entre componentes de la fibra muscular y la estructura funcional del capilar asociado, dado que éste último es la principal vía de suministro de insumos energéticos y nutricionales importantes para la fibra muscular en condiciones normales (Moore y Ruska, 1957; Dubowitz, 1985; Buckley y Bossen, 2013).

Por otra parte, al realizar el análisis de RLM de la variable área de la luz capilar en condición normal (Tabla 17), ésta muestra correlación positiva significativa con: diámetro capilar (Diam cap), pero exhibe correlación negativa con el ancho de la membrana basal de la microvasculatura (AMBm) y el grosor de la línea Z (BZ) ($p < 0.05$). El vínculo que posee el área de la luz con el diámetro capilar, está relacionado con la actividad funcional del vaso capilar y una correspondencia estructural evidente, de modo que, un área del lumen capilar está morfológicamente vinculado a un diámetro capilar mayor, dado que en condiciones normales, ambas favorecen y permiten un flujo sanguíneo continuo y un transporte transepitelial regular (Moore y Ruska, 1957). No obstante, la relación que se observa con el AMBm, indica la correspondencia de una estructura de capilar normal cuando ésta solo comprende una membrana de glicoproteínas que conforma su pared. Mientras que la relación significativa con BZ, sostiene el vínculo estructural entre los dos componentes celulares de este estudio: fibra muscular y microvasculatura asociada.

Una vez discutidas las relaciones de las 4 variables morfométricas en caso control (normal), se pretende describir éstas en condición alterada. En el caso de pacientes con ESP, al generar la RLM del porcentaje de atrofia (%A) (Tabla 18), resulta explicada por la correlación significativa ($p < 0.05$) con el grosor del endotelio capilar (endotelio) y ancho de la membrana basal de la microvasculatura (AMBm) positivamente; y se establece una correlación negativa con el área mitocondrial (Am). Nuevamente se observa la asociación entre la fibra muscular y la microvasculatura ya que la degeneración de la fibra se encuentra principalmente determinada por la condición estructural y funcional de su vaso capilar. El aumento del AMBm, sugiere un proceso de vasculogénesis o reparación vascular () que coincide con el engrosamiento del endotelio (oclusión del lumen); dicho esto, el daño capilar es un indicador de ser promotor de daño en la fibra muscular.

Por otra parte, la disfunción metabólica mitocondrial que constituye el segundo factor más importante en el desarrollo y funcionabilidad óptima del sistema muscular. De forma que una alteración (hinchamiento) de la misma, induce poca utilidad funcional de la fibra, conduciéndola a atrofia (). Tales correlaciones establecidas en la tabla 18, se observan con mayor detalle en la figura 33.

La RLM del diámetro mayor de la mitocondria (DMm) en pacientes con ESP (Tabla 19), se obtuvo que tiene correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con densidad de mitocondrias (dens mit), área mitocondrial (Am), grosor del endotelio vascular (endotelio)

y ancho de la membrana basal de la microvasculatura (AMBm). Es importante señalar, que la mayoría de las correlaciones establecidas, se deben la mitad a variables asociadas a la microvasculatura, de modo que, la actividad o estructura también está definida por daños capilares que se explican por falta de O_2 que imposibilita la respiración mitocondrial (hipoxia a falta de intercambio gaseoso capilar)(Arismendi, 2009; Seyfried y Shelton, 2010.

Las otras correlaciones establecidas (Dens mit y Am), se explica a través de variables mitocondriales presentes en la fibra muscular, las cuales, indican una correspondencia estructural y un factor importante de disfunción metabólica que es reflejo de la morfología de este mismo organelo. Igualmente, las relaciones de las variables morfométricas están explicadas en un análisis de ruta de la figura 34.

Ahora bien, la RLM del grosor de la línea Z (BZ) (Tabla 20), exhibió una correlación estadísticamente significativa con el área de la luz capilar (área luz), el grosor endotelial (endotelio) y el área mitocondrial (Am), tales relaciones se encuentran representadas esquemáticamente en la figura 35. El grosor de la línea Z, está relacionada mayormente con variables pertenecientes a la microvasculatura y al principal organelo asociado a metabolismo celular (mitocondria). Sin embargo, existe una correlación negativa tanto con el área de la luz como con el grosor del endotelio capilar; esto explica la oclusión de la luz por obstrucción del flujo sanguíneo, como uno de los indicadores de falla de intercambios que puedan ser necesarios para el mantenimiento estructural de la fibra. Dicho esto, la lesión capilar tiene una influencia sobre la base estructural normal de la fibra durante la

enfermedad por ser el principal donador de los requisitos fundamentales para su mantenimiento energético y metabólico.

No obstante es conocido, que el engrosamiento de la línea Z no ha sido ampliamente descrito y aún se desconoce a ciencia cierta su aparición. Por otra parte las formas irregulares y la deposición de material de esta estructura, fueron descritas en procesos de apoptosis de células musculares esqueléticas en presencia de enfermedades del tipo reumáticas (Finol y col., 1988).

Por último, a través de un análisis de RLM del área de la luz capilar en pacientes con ESP, se describieron correlaciones existentes significativas ($p < 0.05$) con el diámetro capilar, el grosor de la línea Z, los espacios intermiofibrilares y el área mitocondrial (Tabla 21). Entre sus correlaciones más fuertes se encuentran el diámetro capilar y los espacios intermiofibrilares, pero, estas variables relacionadas mencionadas, tienen un importante componente biológico sobre la luz capilar. Esto se debe a una correspondencia estructural y funcional entre la fibra y el capilar asociado, de modo que una alteración o daño muscular también puede inducir daños microvasculares.

Como se ha mencionado consecutivamente a lo largo de esta discusión, existen variables que se encuentran estructuralmente relacionadas como: el área de la luz con diámetro

capilar y el diámetro mayor de la mitocondria con su área. Estas correlaciones en cualquier sistema son de esperar, debido a la correspondencia estructural inherente existente en un sistema biológico. Dicho de otra manera, el daño de uno de los parámetros celulares en la fibra puede afectar en múltiples niveles al resto de los componentes estructurales dentro de ella, sabiendo que todas, a nivel biológico se encuentran en constante interacción armónica para cumplir el funcionamiento óptimo de la estructura celular.

No obstante, otro conjunto de correlaciones están más vinculadas a la actividad funcional dentro de la fibra muscular como el capilar. Estas últimas pueden ser explicadas a través del estudio de sus interacciones en condición alterada tras ser comparadas en condiciones normales. Entre ellas se describe la disfunción metabólica de mitocondrias (tras un aumento en sus dimensiones), el engrosamiento de la línea Z, grados de atrofia muscular a partir de la desorganización (aumento de espacios intermiofibrilares) y desaparición de la estructura sarcomérica del sistema contráctil (formación de masas o cuerpos indiferenciados de los miofilamentos) que se encuentran presentes y conducen a un proceso de deterioro y disfunción muscular. Además, éstas no dejan de tener relación también con las lesiones microvasculares sobre el cual se infiere deficiencia de transporte transepitelial y problemas asociados a autoinmunidad tras variaciones estructurales como oclusión de la luz, disminución de vesículas y cavéolas y engrosamiento de la membrana basal entre las últimas descritas.

En ese sentido, todas las variaciones estructurales (formas, geometrías) presentes en un sistema biológico siempre encontrarán correspondencia en la alteración de una actividad funcional determinada que induzca un proceso patológico (Weibel, 1969). Sin embargo, sólo un análisis morfométrico y estadístico permitirá establecer y determinar objetivamente las variaciones que tengan relevancia en esta condición definiéndolas no de manera aislada, sino conservando lo mejor posible, la realidad multidimensional en que se encuentran sumergidos todos los patrones estructurales y funcionales de un componente biológico.

CONCLUSIONES

- La ultraestructura del tejido muscular esquelético de pacientes con Esclerosis Sistémica Progresiva exhibe alteraciones en la fibra muscular, tales como, plegamiento del sarcolema, edematización mitocondrial, desorganización del sistema contráctil con desaparición del patrón estriado característico de este tejido y daños en el sistema sarcotubular. La microvasculatura asociada muestra deformaciones del endotelio vascular con oclusión del lumen y engrosamiento de la membrana basal entre las más destacadas.

- La determinación cuantitativa derivada de los parámetros ultraestructurales definidos en la fibra muscular esquelética, permite una caracterización morfométrica de las variaciones descritas en condición normal y alterada.
- La caracterización morfométrica de la ultraestructura normal del músculo esquelético, difiere estadísticamente de la correspondiente a los pacientes con ESP.
- Existen correlaciones de variables morfométricas tanto de la fibra muscular como de la microvasculatura asociada que se establecen en condición normal y difieren en la condición alterada.
- Las variaciones morfométricas y sus relaciones permiten separar las condiciones normal y alterada con técnicas de estadística multivariante.
- Existen variaciones significativas de las variables morfométricas evaluadas en el proceso de transición de la condición sano a enfermo (con ESP).
- El porcentaje de atrofia, el diámetro mayor de la mitocondria, el grosor de la línea Z y el área de luz capilar, constituyen el grupo de variables de mayor relevancia en el estudio de la enfermedad determinadas a partir de un análisis de Regresión Logística.
- Existe una correspondencia estructural y funcional de los componentes de la fibra muscular que coexisten de manera recíproca con la estructura del capilar asociado.
- La aplicación de diferentes técnicas morfométricas y estadísticas permiten la cuantificación y determinación de relaciones biológicas (estructurales y funcionales) existentes entre los componentes fundamentales de la fibra muscular esquelética, lo cual contribuye a la comprensión de procesos biológicos en una enfermedad.

RECOMENDACIONES

- Incluir en el estudio variables clínicas (hematológicas y genéticas), que puedan explicar los distintos fenotipos existentes y característicos de la Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP).
- Realizar estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares de las variables morfométricas derivadas de los hallazgos del análisis estadístico multivariante consideradas en este estudio como indicadores patológicos de ESP.

BIBLIOGRAFÍA

1. Afifi A., Al-Gailany A., Salman J., Bahuth N. 1977. Nerve and muscle in steroid-induced weakness in the rabbit. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 58: 143-148.
2. Afzelius B., Maunsbach A. 2004. Biological ultrastructure research; the first 50 years. *Tissue & Cell* 36: 83-94.
3. Agarwal S., Tan F., Arnett F. 2008. Genetics and genomic studies in scleroderma (systemic sclerosis). *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 34: 17-40.
4. Alegre J., Beltrán E., Chalmeta I., Fernández N., Ivorra J., Román J. 2008. Esclerosis Sistémica. Págs.: 193-234. Capítulo 11 en: J. Castellano, J. Román, J. Rosas (eds.), *Enfermedades Reumáticas: Actualización SVR*. Sociedad Valenciana de Reumatología, Primera Edición, Valencia, España.
5. Anbiaee N., Tafakhori Z. 2011. Early diagnosis of progressive systemic sclerosis (scleroderma) from a panoramic view: report of three cases. *Dentomax. R.* 40: 457-462.
6. Andrew A., Agnes J. 1980. Pancreatic necrosis in progressive systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 39: 396-398.

7. Arismendi-Morillo G. 2009. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 2062-2068.
8. Asokan G., Anuradha G., Jeelani S., Gautham N., Aswini. 2013. Systemic Sclerosis: a case report and review of literature. *J. Indian Acad. Oral Med. Radiol.* 25: 333-336.
9. Baak J. 1985. Quantitative Pathology Today – A Technical View. *Path. Res. Pract.* 182: 396-400.
10. Baak J.; Oort J., Bouw G., Stolte L. 1977. Quantitative morphology: methods and materials. Stereology and morphometry. *Europ. J. Obstet. Gynec. Repord. Biol.* 7: 43-52.
11. Barbany J. 2002. Fisiología del ejercicio físico y el entrenamiento. Editorial Paidotribo. Primera edición. Barcelona-España. pp 13-17.
12. Batista S., Velázquez G., Avilés del Campo E., Pérez L. 2014. Mecanismos etiopatogénicos en la esclerosis sistémica. *Rev. reumatología* 16: 304-308.
13. Black, C. 1993. The aetiopathogenesis of systemic sclerosis. *J. Intern. Med.* 234: 3-8.
14. Bergström, J. 1962. Muscle electrolyte in man. *Scand. J. Cell. Invest.* 68:1-110.
15. Bohringer S., Hecker H. 1974. Quantitative ultrastructural differences between strains of the trypanosoma brucei subgroup during transformation in blood. *J. Protozool.* 21: 694-698.
16. Bollinger A., Jager K., Siegenthaler W. 1986. Microangiopatía de la esclerosis sistémica progresiva. *Arch. Intern. Med.;* 146:1541-1545.
17. Bookstein, F.L. 1986. Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Statistical science* 1: 181-242.
18. Briggs R., Scordilis S., Powell J. 1995. Myofibrillogenesis in rodent skeletal muscle in vitro: two pathways involving thick filament aggregates. *Tissue & Cell* 27: 91-104.
19. Buckley A., Bossen E. 2013. Skeletal muscle microvasculature in the diagnosis of neuromuscular disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 72: 906-918.
20. Caliviari M., Lana M., Leite V., Tafuri W. 1995. Morphological and morphometric study of atrial specific granules and other secretory components in dogs experimentally infected with trypanosoma cruzi. *J. Exp. Path.* 76: 299-307.
21. Chalkley H. 1943. Method for the Quantitative Morphologic Analysis of Tissues. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1: 47-53.
22. Clarkson P., Hubal M. 2002. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 81: S52-69.
23. Clements P., Furst D., Champion D., Bohan A., Harris R., Levy J., Paulus H. 1978. Muscle disease in Progressive Systemic Sclerosis – Diagnostic and Therapeutic considerations. *Arthritis Rheum.* 21: 62-71.
24. Clements P., Roth M., Elashoff R., Tashkin D., Goldin J., Silver R., Sterz M., Seibold J., Schraufnagel D., Simms R., Bolster M., Wise R., Steen V., Mayes M., Connelly K., Metersky M., Furst D.(2007). Scleroderma lung study (SLS): differences in the presentation and course of patients with limited versus diffuse systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 66:1641-1647.
25. Collan, Y. 1984. Morphometry in pathology: another look at diagnostic histopathology. *Pat. Res. Pract.* 179: 189-192.

26. Corona B., Greising S. 2016. Challenges to acellular biological scaffold mediated skeletal muscle tissue regeneration. *Biomaterials* 104: 238-246.
27. Cuenca E. 2006. Fundamentos de fisiología. International Thomson editores. Paraninfo, S.A. Primera edición. Madrid-España.
28. Dalakas, M. 2011. An update on inflammatory and autoimmune myopathies. *Neuropath. Appl. Neuro.* 37: 226-242.
29. Dalakas, M. 2015. Inflammatory Muscle Diseases. *N. Engl. J. Med.*; 372:1734-47.
30. D'Emilio A., Biagiotti L., Burattini S., Battistelli M., Canonico B., Evangelisti C., Ferri P., Papa S., Martelli A., Falcieri E. 2010. Morphological and biochemical patterns in skeletal muscle apoptosis. *Histol. Histopathol.* 25: 21-32.
31. Derk C., Jimenez S. 2003. Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmun. Rev.*; 2: 181-191
32. Dunnill M. 1962. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax* 17: 320-328.
33. Durán C., Rodríguez-Bolívar D., Roschman-González A., Strauss M., Tejero F. 2010. Análisis cuantitativo del crecimiento y cambio morfométrico en poblaciones de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* mantenidos en cultivos axénicos puros y mixtos. Boletín de malariología y salud ambiental. Vol L, N° 1.
34. Finol H. 2014. Técnica del Corte Fino para microscopía electrónica de transmisión. Facultad de Ciencias (U.C.V) – Centro de Microscopía Electrónica. Caracas – Venezuela.
35. Finol H., Márquez A., Rivera H., Montes de Oca I., Muller B. 1994. Ultrastructure of systemic sclerosis inflammatory myopathy. *J Submicr Cytol Pathol* 26: 245-253.
36. Finol H., Montagnani S., Márquez A., Montes de Oca I., Müller B. 1990. Ultrastructural pathology of skeletal muscle in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Rheumatol.* 17: 210-219.
37. Finol H., Müller B., Montes de Oca I., Márquez A. 1988. Ultrastructure of skeletal muscle in rheumatoid miositis. *J. Rheumatol.* 15: 552-555.
38. Gabrielli A., Avvedimento E., Krieg T. 2009. Mechanisms of Disease Scleroderma. *N. Engl. J. Med.* 360: 1989-2003.
39. Gil J., Deligdisch L. 1989. Interactive morphometric procedures and statistical analysis in the diagnosis of ovarian dysplasia and carcinoma. *Path. Res. Pract.* 185: 680-685.
40. Glauert A. Rogers G., Glauert R. 1956. A new embedding medium for electron microscopy. *Nature.* 178: 803-803.
41. Hamilton P., Allen D. 1995. Morphometry in Histopathology. *J. Pathol.* 175: 369-379.
42. Hassan M., Bendjuia G., Bodni R., Endre J., Fernández R., Llahyah Y., Belén M., Manzano R., Melloni M., Saposnik M. *Actualización 2015 -Consenso sobre esclerodermia* [en línea]. Sociedad Argentina de Dermatología, 2016. <http://www.sad.org.ar/wp-content/uploads/2016/04/consenso-esclerodermia.pdf> [consulta: 16 agosto 2016]
43. Helmbold P., Fiedler E., Fischer M., Marsch W. 2004. Hyperplasia of dermal microvascular pericytes in scleroderma. *Cutan. Pathol.* 31: 431-440.

44. Hilton-Jones D. 2003. Diagnosis and treatment of inflammatory muscle diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 74:ii25–ii3.
45. Hoare C. 1964. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. *J. protozool.* 11: 200-207.
46. Huxley H. 1969. The mechanism of muscular contraction- recent structural studies suggest a revealing model for cross-bridge action at variable filament spacing. *Science.* 164: 1356-1366.
47. Ibarra G., Tovar V., Nadorfy de López E., Finol H. 2007. Alteraciones ultraestructurales en la microvasculatura de la región de la cara en pacientes VIH. *Acta Odontológica Venezolana* 45: 1-8.
48. James N., Meek G. 1979. Stereological analyses of the structure of mitochondria in pigeon skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* 202: 493-503.
49. Jerusalem F., Rakusa M., Engel A.G., Macdonald R. 1974. Morphometric analysis of skeletal muscle capillary ultrastructure in Inflammatory Miopathies. *J. Neurol. Sci.* 23:391-402.
50. Jerusalem f., Engel A., Gómez M. 1974. Duchenne Distrophy- Morphometric study of the muscle microvasculature. *Brain* 97: 115-122.
51. Jiménez S., Derk C. 2004. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann. Intern. Med.* 140:37-50.
52. Jiménez S., Mendoza F. 2015. Scleroderma: Background, Pathophysiology, Etiology. <http://emedicine.medscape.com/article/331864-overview#showall> [consulta: 26 agosto 2016]
53. Karassa F., Ioannidis J. 2008. Mortality in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 26: S85-S93.
54. Karnovsky M. 1965. A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27: 137A.
55. Kayser G., Kayser K. 2012. Quantitative pathology in virtual microscopy: History, applications, perspectives. *Acta Histochemical.* 15: 527-532.
56. Koenig M., Dieudé M., Senécal J-L. 2009. Predictive value of antinuclear autoantibodies: The lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmun. Rev.* 7: 588-593.
57. Lazarides E. 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature.* 283: 249–256
58. Lieber R. 2002. Skeletal muscle structure, function and plasticity - The physiological basis of rehabilitation. Lippincott Williams & Wilkins. Segunda edición. Philadelphia – USA.
59. Luft J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-14.
60. Maaloe O., Birch-Andersen A. 1956. On the organization of the “nuclear material” in *Salmonella typhimurium*. *6th Symp. Soc. Gen. Microbiol* 6: 261-278.
61. Marchevski A., Gil J., Jeanty H. 1987. Computerized interactive morphometry in pathology: current instrumentations and methods. *Hum. Pathol.* 18: 320-331.

62. Maricq H., Spencer-Green G., LeRoy E. 1976. Skin capillary abnormalities as indicators of organ involvement in scleroderma (systemic sclerosis), Raynaud's síndrome and Dermatomyositis. *Am. J. Med.* 51: 862-870.
63. Mastaglia F., Phillips B., Zilco P. 1997. Treatment of Inflammatory Myopathies. *Muscle & Nerve* 20: 651- 664.
64. Mastaglia E. & Walton J. 1982. *Skeletal Muscle Pathology*. En: Landon D.N. Skeletal muscle - normal morphology, development and innervations. Edinburgh, Churchill Livingstone, pp.1-87; 89-94.
65. Mayes, M. 2005. Race, scleroderma, and survival: why is there a difference?. *J. Rheumatol.* 32: 1873-1874.
66. Medsger T., Rodnan G., Moossy J., Vester J. 1968. Skeletal Muscle Involvement in Progressive Systemic Sclerosis (Scleroderma). *Arthritis Rheumatol.* 11: 544- 567.
67. Mercer. E., Birbeck. M. 1979. Manual de Microscopia Electrónica para Biólogos. H. Blume ediciones. Segunda edición. Rosario-Madrid. pp 58-60
68. Miner J., Yurchenco P. 2004. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20: 225-284.
69. Montes S., Benet M., Ramos L., Cano E., Pérez E. 2015. Factores de riesgo cardiovasculares e hiperreactividad cardiovascular en jóvenes venezolanos. *Rev. Finlay.* 5: 108-117.
70. Moore D., Ruska H. 1957. The fine structure of capillaries and small arteries. *J. Biophysic and Biochem. Cytol.* 3: 457: 461.
71. Mouthon L., Bérezné A., Guillaume B., Noël L., Villiger P., Guillevin L. 2009. Scleroderma Renal Crisis: A Rare but Severe Complication of Systemic Sclerosis. *Clinic. Rev. Allerg. Inmmunol.* 40:84-91.
72. Norton W., Huro E., Lewis D. 1968. Evidence of microvascular injury in scleroderma and systemic lupus erythematosus; quantitative study of microvascular bed. *J. Lab Clin. Med.* 71: 919-933.
73. Palade, G. 1952. A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* 95: 285-298.
74. Prescott R., Freemont A., Jones C., Hoyland J., Fielding P. 1992. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J. Pathol.* 166: 255-263.
75. Randall D., Burggren W., French K. 1997. Fisiología animal mecanismos y adaptaciones. McGraw Hill Interamericana de España, S. A. Cuarta edición. Getafe-Madrid. pp 381-387.
76. Ranque, F-J. Authier, V. Le-Guern, C. Pagnoux, A. Berezne, Y. Allanore, D. Launay, E. Hachulla, A. Kahan, J. Cabane, R Gherardi, L. Guillevin, L. Mouthon. 2009. A descriptive and prognostic study of systemic sclerosis-associated myopathies. *Ann. Rheum. Dis.*; 68:1474–1477.
77. Reymont, R. 2008. Morphometrics: An Historical Essay. Págs: 9-24. Capítulo 2 en: Elewa A.M.T. Lecture notes in earth sciences: Morphometrics for Nonmorphometricians. Springer-Verlag. Primera Edición. Berlín-Alemania.

78. Reynolds E. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208-212.
79. Roberts N., Cabeen W. 1980. Atrioventricular nodal function in progressive systemic sclerosis: electrophysiological and morphological findings. *Br. Heart. F.* 44: 529-533.
80. Rohlf, F.J. 1990. Morphometrics. *Annu. Rev. Ecol. Syst* 21: 299-316.
81. Roumm A., Whiteside T., Medsger T., Rodnan G. (1984). Lymphocytes in the skin of patients with Progressive Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* 27: 645- 653.
82. Russell M., Hanna W. 1983. Ultrastructure of muscle microvasculature in progressive systemic sclerosis, relation to clinical weakness. *J. Rheumatol.* 10: 741-747.
83. Sandri M., Minetti C., Pedemonte M., Carraro U. 1998. Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. *Lab. Invest.* 78: 1005-1016.
84. Sanes J. 2003. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 278: 12601-12604.
85. Sanes J., Marshall L., McMahan U. 1978. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J. Cell. Biol.* 78: 176-198.
86. Santander R. 1968. Técnicas de microscopía electrónica en biología. Aguilar, S.A. Primera edición. Madrid – España.
87. Scelsi R. 1992. Morphometric analysis of skeletal muscle fibres and capillaries in mitochondrial myopathies. *Path. Res. Pract.* 188: 607-611.
88. Schmalbruch H. 1985. Skeletal muscle. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Primera edición. Munich-Alemania.
89. Seibold J. 2006. Esclerodermia págs.: 1293-1317 en: Harris E., Budd R., Genovese M., Firestein G., Sergent J., Sledge C. en Kelley Tratado de Reumatología, Elsevier España, S.A. Séptima Edición. Madrid-España.
90. Silver R. 1991. Clinical aspects of systemic sclerosis (scleroderma). *Ann. Rheum. Dis.* 50:854-861.
91. Sjöström M., Ängquist K., Bylund A., Fridén J., Gustavsson L., Scherstén T. 1982. Morphometric analyses of human muscle fiber types. *Muscle & Nerve.* 5: 538-553.
92. Squire, J. 1997. Architecture and function in the muscle sarcomere. *Current Opinion in Structural Biology.* 7: 247-257.
93. Squire J., Edman A., Freundlich A., Harford J., Sjöström M. 1982. Muscle structure, cryo-methods and image analysis. *J. Microsc.* 125: 215-225.
94. Stevens J., Godfrey D. 1991. Numerical taxonomy of trypanozoon based on polymorphisms in a reduced range of enzymes. *Parasitology.* 104: 75-86.
95. Tejero F., Roschman-González A., Perrone-Carmona T., Aso P. 2008. Trypanosoma evansi: a quantitative approach to the understanding of the morphometry-hematology relationship throughout experimental murine infections. *J. Protozool. Res.* 18: 34-47.
96. Tews D. 2005. Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle Nerve* 32: 443-458.
97. Tokuyasu K., Dutton A., Singer S. 1983. Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeleton) localization and intermediate filament organization in chicken cardiac muscle. *J. Cell. Biol.* 96:1736–1742.

98. True L.1996. Morphometric applications in anatomic pathology. *Hum. Pathol.* 27: 450-467.
99. Urbina C., Rodríguez P., Finol H., Mérida T., Ogura M. 1997. Introducción a la microscopía electrónica. Guía Teórico-Práctica. Facultad de Ciencias – Centro de Microscopía Electrónica. Caracas – Venezuela.
100. Velasco E., Gledhill T., Linares C., Roschman-González, A. 2008. Análisis ultraestructural del músculo *levator auris longus* de ratón intoxicado *in vivo* por la neurotoxina botulínica tipo A. *Invest. Clin.* 49: 469-486.
101. Walton J., Adams R. 1959. Polymyositis. Edinburgh and London. E. and S. Livingstone –Inglaterra. p.165.
102. Watson M. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochim. Cytol.* 4: 475-478.
103. Weibel E. 1969. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.* 26: 235-302.
104. Weibel E., Elias H. 1967. Introduction to stereology and morphometry. En: Weibel E. y Elias H. Quantitative Methods in morphology. Pp 3. Berlin – Alemania.
105. Weibel E., Kistler G., Scherle W. 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell. Biol.* 1: 23-28.
106. Weibel E., Knight B. 1964. A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier. *J. Cell. Biol.* 21: 367-384.
107. Wide C., Bartels P., Bibbo M, Dytch H. 1989. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Hum. Pathol.* 20:549-571.
108. Winkelmann R. (1971). Classification and pathogenesis of scleroderma. *Mayo Clin. Proc.* 46: 83-91.
109. Yamamoto T. 2011. Autoimmune mechanisms of scleroderma and a role of oxidative stress.
110. Zvaritch E., Kraeva N., Bombardier E., McCloy R., Depreux F., Homyard D., Kraev A., Seidman C., Seidman J., Tupling A., MacLennan D. 2009. Ca²⁺ dysregulation in Ryr1 (i4895T/wt) mice causes congenital myopathy with progressive formation of minicores, cores and nemaline rods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 21813-21818.

ANEXO

Tabla 1*. Prueba de Shapiro-Wilk de normalidad para las variables morfométricas en estudio. La prueba sugiere distribución normal para las variables Am, DMm, Dens Mit, Diam cap y área de la luz.

Variables	W	p
AMBm	0.89	0.00
AMBfm	0.91	0.00
EI	0.86	0.00
%A	0.79	0.00
Am	0.92	0.06
DMm	0.97	0.11
BZ	0.86	0.00
Dens Mit	0.94	0.07

Endotelio	0.87	0.00
Diám cap	0.82	0.06
Dens Cav	0.85	0.00
Area Luz	0.82	0.05
*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit:		

Tabla 2*. Prueba de Levene de homogeneidad de varianza para las variables morfométricas en condición normal y alterada. La prueba sugiere significancia estadística para las variables AMBm, AMBfm, EI, %A, BZ, endotelio y dens cav.

Variables	Levene F(1,GL)	GL	<i>p</i>
AMBm	27.63	198	0.000
AMBfm	23.07	198	0.000
EI	37.57	198	0.000
%A	51.52	198	0.000
Am	0.049	198	0.823
DMm	1.082	198	0.299
BZ	25.77	198	0.000
Dens Mit	11.24	198	0.000
Endotelio	44.35	198	0.000
Diám cap	0.20	198	0.649
Dens Cav	31.95	198	0.000
Area Luz	1.56	198	0.212

*AMBm: ancho de la membrana basal de la microvasculatura AMBfm: ancho de la membrana basal de la fibra muscular, EI: espacios intermiofibrilares, %A: porcentaje de atrofia, Am: área mitocondrial, DMm: diámetro mayor de la mitocondria, BZ: ancho de la línea Z, Dens mit: Densidad de mitocondrias, Diám cap: diámetro capilar, Dens cav: densidad de cavéolas en endotelio vascular, Area luz: área de la luz capilar.