



**Evaluación de músculos esqueléticos sometidos a periodos de isquemia
inducida y reperfusión: análisis histoquímico y morfométrico**

**Informe final del Trabajo de investigación para optar por el título de Magister
en Ciencias Biomédicas**

DORIS HAYDEE ROSERO SALAZAR, Est. Maestría en Ciencias Biomédicas
Director del trabajo: LILIANA SALAZAR MONSALVE, Msc.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA
Santiago de Cali, 1 de septiembre de 2014

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Santiago de Cali, 1 de septiembre de 2014

Dedicado a

.... Dios, por la vida y las personas que me acompañaron en este proceso.

*... quienes me brindaron su confianza y consejo, los
cuales hicieron posible llevar a cabo este trabajo.*

... mi familia, por su comprensión y respaldo.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación es el logro de un esfuerzo realizado por muchas personas quienes con su conocimiento, paciencia y respaldo hicieron posible la culminación del mismo.

Agradezco a mis *Profes* de Histología, Dra. Liliana Salazar y Dr. Mario Alejandro Ortiz, por haber confiado en mí, por su motivación y valiosos consejos.

A las Profesionales de Laboratorio Nhora Holguín y Martha Ceballos, por permitirme aprender de sus habilidades y su especial acompañamiento durante el procesamiento de las muestras.

A Nicolás, por su dedicación y esmero en la primera fase de este trabajo.

A mis compañeros y docentes del Grupo de Investigación Tejidos Blandos y Mineralizados, por su retroalimentación crítica y constructiva en cada una de las presentaciones.

A todas aquellas personas que me brindaron su amistad, apoyo y ánimo en los momentos difíciles. Algunas siguen acompañándome y otras en mis recuerdos y mi corazón, en donde estén, les agradezco todo lo que me han brindado y todas sus bendiciones.

Contenido	Página
1. Resumen	15
2. Introducción	17
3. Problema de investigación	18
4. Justificación	19
5. Marco teórico y estado del conocimiento	21
5.1. Desarrollo embrionario	21
5.2. Matriz extracelular intramuscular o tejido conectivo intramuscular	22
5.3. Ultraestructura de las fibras musculares esqueléticas	26
5.4. Clasificación de las fibras musculares	29
5.5. Músculos extensor radial largo del carpo y soleo	30
5.6. Torniquete neumático	32
5.7. Cambios de lesión y regeneración en el musculo esquelético y la matriz extracelular intramuscular causados por isquemia y reperfusión	33
6. Objetivos	40
6.1. Objetivo general	40
6.2. Objetivos específicos	40
7. Planteamiento de hipótesis	40
8. Diseño metodológico	41
8.1. Tipo de estudio	41
8.2. Unidad de análisis	41
8.3. Criterios de inclusión	42
8.4. Consideraciones éticas	42
8.5. Diseño experimental	42
8.5.1. Fase I – Quirúrgica	44
8.5.1.1. Distribución de los grupos	44
8.5.1.2. Preparación del espacio físico	45

8.5.1.3. Sedación profunda, mantenimiento anestésico y analgesia	46
8.5.1.4. Procedimiento de isquemia y reperfusión	48
8.5.1.5. Eutanasia	50
8.5.2. Fase II - Procesamiento histoquímico	50
8.5.2.1. Disección de los músculos, inclusión y fijación por congelación	50
8.5.2.2. Inclusión y corte	51
8.5.2.3. Procedimiento histoquímico (tinción)	52
8.5.3. Fase III – Análisis de imágenes	53
8.5.3.1. Toma y almacenamiento de imágenes	53
8.5.3.2. Morfometría	55
8.5.3.2.1. Procesamiento y análisis morfométrico	55
8.5.3.3. Clasificación de las variables de estudio	58
8.5.3.4. Análisis estadístico	60
8.5.3.5. Impacto Ambiental	61
9. Resultados	62
9.1. Condiciones del espacio y procedimientos	62
9.2. Diferencias en el peso de los biomodelos	64
9.3. Diferencias en el peso de los músculos	65
9.4. Pruebas de concordancia intraobservador e interobservador	67
9.5. Validación de los supuestos de normalidad	72
9.6. Características histoquímicas y morfométricas de los grupos control	73
9.7. Características histoquímicas y morfométricas de grupos experimentales	75
9.7.1. Distribución de las fibras musculares esqueléticas	76
9.7.1.1. En una hora de isquemia	76
9.7.1.2. En tres horas de isquemia	77
9.7.1.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	79
9.7.2. Distribución de la matriz extracelular intramuscular	81
9.7.2.1. En una hora de isquemia	81
9.7.2.2. En tres horas de isquemia	82
9.7.2.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	84
9.7.3. Distribución de la predominancia según el tipo de fibra	86
9.7.3.1. Tinción nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolium reductasa	86
9.7.3.1.1. Fibra oxidativas	86
9.7.3.1.1.1. En una hora de isquemia	86
9.7.3.1.1.2. En tres horas de isquemia	87

9.7.3.1.1.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	89
9.7.3.1.2. Fibras glucolíticas	92
9.7.3.1.2.1. En una hora de isquemia	92
9.7.3.1.2.2. En tres horas de isquemia	93
9.7.3.1.2.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	95
9.7.3.1.3. Fibras intermedias	97
9.7.3.1.3.1. En una hora de isquemia	97
9.7.3.1.3.2. En tres horas de isquemia	98
9.7.3.1.3.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	100
9.7.3.2. Tinción miosina adenosin trifosfatasa a preincubación ácida 4.6	102
9.7.3.2.1. Fibras de contracción lenta	102
9.7.3.2.1.1. En una hora de isquemia	102
9.7.3.2.1.2. En tres horas de isquemia	103
9.7.3.2.1.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	104
9.7.3.2.2. Fibras de contracción rápida	107
9.7.3.2.2.1. En una hora de isquemia	107
9.7.3.2.2.2. En tres horas de isquemia	108
9.7.3.2.2.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	110
9.7.3.2.3. Fibras de contracción intermedia	113
9.7.3.2.3.1. En una hora de isquemia	113
9.7.3.2.3.2. En tres horas de isquemia	114
9.7.3.2.3.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	116
9.7.4. Cambios de lesión	118
9.7.4.1. Infiltración celular en el tejido conectivo intramuscular	118
9.7.4.2. Cambios en la forma de la célula	120
9.7.4.2.1. En una hora de isquemia	120
9.7.4.2.2. En tres horas de isquemia	122
9.7.4.2.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	123
9.7.4.3. Cambios en el tamaño celular	125
9.7.4.3.1. En una hora de isquemia	125
9.7.4.3.2. En tres horas de isquemia	126
9.7.4.3.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	127
9.7.4.4. Cambios en el citoplasma celular	129
9.7.4.4.1. En una hora de isquemia	129
9.7.4.4.2. En tres horas de isquemia	131
9.7.4.4.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	133
9.7.4.5. Cambios en la localización de los núcleos de los miocitos	137
9.7.4.5.1. En una hora de isquemia	137

9.7.4.5.2. En tres horas de isquemia	139
9.7.4.5.3. Comparación una y tres horas de isquemia	140
9.7.4.6. Evidencia de necrosis	142
9.7.4.6.1. En una hora de isquemia	142
9.7.4.6.2. En tres horas de isquemia	143
9.7.4.6.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	144
9.7.4.7. Presencia de miotubos o mioblastos (regeneración)	145
9.7.4.7.1 En una hora de isquemia	145
9.7.4.7.2. En tres horas de isquemia	146
9.7.4.7.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia	147
10. Discusión	148
10.1. Torniquete neumático y tinciones histoquímicas	149
10.2. Lesión por reperfusión	151
10.3. Músculos extensor radial largo del carpo y sóleo	153
11. Conclusiones	160
12. Recomendaciones	161
13. Divulgación	162
14. Anexos	163
14.1. Descripción de imágenes de los grupos control y experimentales	163
14.2. Registro de características del espécimen y procedimiento	249
14.3. Procedimientos operacionales estándar (POEs)	250
14.3.1. POE para disección	250
14.3.2. POE para tinción histoquímica convencional hematoxilina-eosina	252
14.3.3. POE para tinción histoquímica convencional Tricrómica de Gomori	255
14.3.4. POE para tinción de histoquímica enzimática NADH-TR	258
14.3.5. POE para tinción de histoquímica enzimática mATPasa a pH 4.6	261
14.3.6. POE para medición y pruebas de concordancia	264
14.4. Características de los equipos utilizados	275
14.5. Aval del comité de ética animal	276
14.6. Registro del torniquete neumático	277
15. Referencias bibliográficas	278

Lista de cuadros	Página
Cuadro 1. Constitución de la matriz extracelular intramuscular	25
Cuadro 2. Grupos control	44
Cuadro 3. Grupos experimentales de isquemia	44
Cuadro 4. Grupos experimentales de isquemia-reperfusión	44
Cuadro 5. Administración anestésica	46
Cuadro 6. Inducción anestésica	47
Cuadro 7. Esquema de mantenimiento anestésico	47
Cuadro 8. Parámetros de toma de imágenes	54
Cuadro 9. Morfometría en imágenes de músculo esquelético	57
Cuadro 10. Clasificación de las variables establecidas para el estudio	58

Lista de figuras

Figura 1. Formación de fibras musculares durante el desarrollo intrauterino	21
Figura 2. Preparado histológico en corte transversal del musculo soleo	23
Figura 3. Organización de los fascículos musculares y perimysio	24
Figura 4. Distribución de los tres tipos de fibras en tinción NADH-TR	30
Figura 5. Predominancia oxidativa en músculo sóleo por m ATP asa	32
Figura 6. Clasificación taxonómica del biomodelo Wistar	41
Figura 7. Representación esquemática del diseño experimental	43
Figura 8. Sección del cubículo asignado para desarrollar los procedimientos	45
Figura 9. Equipos y medicamentos en el procedimiento	45
Figura 10. Administración de isofluorano vía inhalatoria en cámara de vidrio	47
Figura 11. Dispositivo para inducción de isquemia	48
Figura 12. Procedimiento de isquemia	49
Figura 13. Disección músculos sóleo y extensor radial longo del carpo	51
Figura 14. Secuencias de almacenamiento de las imágenes adquiridas	54
Figura 15. Cálculo de tamaño muestral de las imágenes para Morfometría	55
Figura 16. Procesamiento digital de una imagen	56
Figura 17. Conversión de imágenes en color a escala de grises	57
Figura 18. Seguimiento a las condiciones ambientales del bioterio	62
Figura 19. Presiones de isquemia aplicadas a los biomodelos	63
Figura 20. Tiempo en minutos de la duración de la disección	63

Figura 21. Variación en el peso de los músculos	65
Figura 22. Diferencias en peso músculos extensor radial largo del carpo	66
Figura 23. Diferencias en peso entre músculos sóleo	66
Figura 24. Comparación entre observadores para áreas	70
Figura 25. Comparación entre observadores área de matriz extracelular	71
Figura 26. Comparación entre observadores área que ocupan las fibras	71
Figura 27. Prueba de linealidad en la distribución de los datos	72
Figura 28. Comparación de áreas entre fibras y el tejido conectivo	73
Figura 29. Distribución de las fibras en una hora de isquemia más reperfusión	77
Figura 30. Distribución de las fibras en tres horas de isquemia más reperfusión	78
Figura 31. Diferencias en el área que ocupan las fibras musculares	79
Figura 32. Distribución de la matriz extracelular en una hora de isquemia	82
Figura 33. Distribución de la matriz extracelular en tres horas de isquemia	83
Figura 34. Diferencias en el área que ocupa la matriz extracelular	84
Figura 35. Distribución de las fibras oxidativas en una hora de isquemia	87
Figura 36. Distribución de las fibras oxidativas en tres horas de isquemia	88
Figura 37. Diferencias en el área que ocupan las fibras oxidativas	90
Figura 38. Distribución de las fibras glucolíticas en una hora de isquemia	93
Figura 39. Distribución de las fibras glucolíticas en tres horas de isquemia	94
Figura 40. Diferencias en el área que ocupan las fibras glucolíticas	95
Figura 41. Distribución de las fibras intermedias en una hora de isquemia	98
Figura 42. Distribución de las fibras intermedias en tres horas de isquemia	99
Figura 43. Diferencias en el área que ocupan las fibras intermedias	100
Figura 44. Distribución de las fibras de contracción lenta en una hora	103
Figura 45. Distribución de las fibras de contracción lenta en tres horas	104
Figura 46. Diferencias área que ocupan las fibras de contracción lenta	105
Figura 47. Distribución de las fibras de contracción rápida en una hora	108
Figura 48. Distribución de las fibras de contracción rápida en tres horas	109
Figura 49. Diferencias área que ocupan las fibras de contracción rápida	111
Figura 50. Distribución de las fibras intermedias en una hora de isquemia	114
Figura 51. Distribución de las fibras intermedias en tres horas de isquemia	115
Figura 52. Diferencias área que ocupan las fibras intermedias	116
Figura 53. Comparación infiltración celular en el conectivo extensor radial	119
Figura 54. Comparación infiltración celular en el conectivo soleo	120
Figura 55. Fibras hexagonales y circulares en una hora de isquemia	121
Figura 56. Fibras hexagonales y circulares en tres horas de isquemia	122
Figura 57. Comparación de los cambios en las formas de las fibras	123
Figura 58. Fibras con edema y atrofia en una hora de isquemia	125

Figura 59. Fibras con edema y atrofia en tres horas de isquemia	126
Figura 60. Comparación entre edema y atrofia	127
Figura 61. Fibras con cambios en el citoplasma en una hora	129-130
Figura 62. Fibras con cambios en el citoplasma en tres horas	131-132
Figura 63. Comparación de los cambios en el citoplasma celular	134-135
Figura 64. Cambios en la localización de los núcleos en una hora	138
Figura 65. Cambios en la localización de los núcleos en tres horas	139
Figura 66. Comparación de los cambios en la localización de los núcleos	140-141
Figura 67. Necrosis en una hora de isquemia	143
Figura 68. Necrosis en tres horas de isquemia	143
Figura 69. Comparación de fibras que presentan necrosis	144
Figura 70. Presencia de miotubos/mioblastos en una hora de isquemia	146
Figura 71. Presencia de miotubos/mioblastos en tres horas de isquemia	146
Figura 72. Comparación de la presencia de miotubos o mioblastos	147

Lista de tablas	Página
Tabla 1. Diferencias en el peso de cada biomodelo	64
Tabla 2. Supuesto de normalidad para linealidad	68
Tabla 3. Supuesto de normalidad para distribución normal	68
Tabla 4. Concordancia intraobservador para investigadora	68
Tabla 5. Concordancia intraobservador para experto	69
Tabla 6. Concordancia interobservador	69
Tabla 7. Prueba intra e inter observador para áreas	70
Tabla 8. Prueba interobservador para área que ocupa la matriz extracelular	70
Tabla 9. Prueba interobservador para el área que ocupan las fibras	70
Tabla 10. Prueba de normalidad en la distribución de los datos	72
Tabla 11. Áreas que ocupan las fibras y el tejido conectivo en el grupo control	73
Tabla 12. Predominancia de los tipos de fibras para cada músculo, NADH-TR	74
Tabla 13. Predominancia de los tipos de fibras para cada músculo, mATPasa	74
Tabla 14. Medición del área que ocupan las fibras musculares en 10x	80
Tabla 15. Medición del área que ocupan las fibras musculares en 40x	80
Tabla 16. Medición área que ocupa la matriz extracelular 10x	85
Tabla 17. Medición área que ocupa la matriz extracelular 40x	85
Tabla 18. Medición área que ocupan las fibras oxidativas 10x	91
Tabla 19. Medición área que ocupan las fibras oxidativas 40x	91
Tabla 20. Medición área que ocupan las fibras glucolíticas 10x	96
Tabla 21. Medición área que ocupan las fibras glucolíticas 40x	96
Tabla 22. Medición área que ocupan las fibras intermedias 10x	101
Tabla 23. Medición área que ocupan las fibras intermedias 40x	101
Tabla 24. Medición área que ocupan las fibras de contracción lenta 10x	106
Tabla 25. Medición área que ocupan las fibras de contracción lenta 40x	106
Tabla 26. Medición área que ocupan las fibras de contracción rápida 10x	112
Tabla 27. Medición área que ocupan las fibras de contracción rápida 40x	112
Tabla 28. Medición área que ocupan las fibras intermedias 10x	117
Tabla 29. Medición área que ocupan las fibras intermedias 40x	117
Tabla 30. Conteo de fibras con forma hexagonal en ambos músculos	124
Tabla 31. Conteo de fibras con forma circular en ambos músculos	124
Tabla 32. Conteo de fibras que presentan aumento en el tamaño	128
Tabla 33. Conteo de fibras que presentan disminución en el tamaño	128
Tabla 34. Conteo de fibras con desorganización del citoplasma	135
Tabla 35. Conteo de fibras con presencia de vacuolas citoplasmáticas	135
Tabla 36. Conteo de fibras con presencia de fractura por congelación	136

Tabla 37. Conteo de fibras con infiltración focal parcial	136
Tabla 38. Conteo de fibras con infiltración focal completa	137
Tabla 39. Conteo de fibras que presentan núcleos de localización periférica	141
Tabla 40. Conteo de fibras que presentan núcleos de localización central	141
Tabla 41. Conteo de fibras con núcleos no evidentes o ausentes	142
Tabla 42. Conteo de fibras con evidencia de necrosis	145
Tabla 43. Conteo de miotubos/mioblastos en ambos músculos	147

1. Resumen

Las fibras musculares esqueléticas se clasifican de acuerdo con su metabolismo, tipo de contracción o isoforma de MHC (myosin heavy chain). Las características son diferentes en cada tipo de fibra, lo que las hace tolerantes en mayor o menor proporción frente a las lesiones por isquemia, secundarias a la carencia de sustratos metabólicos para la producción de ATP. Una vez restituida la circulación y como consecuencia de la reperfusión, se produce respuesta inflamatoria y generación de radicales libres, eventos que causan daño celular.

El objetivo del presente estudio es caracterizar los cambios histoquímicos y morfométricos presentados en isquemia y reperfusión, en los músculos extensor radial largo del carpo y sóleo.

Para ello se diseñó un estudio experimental en el que se utilizaron aleatoriamente 42 biomodelos, ratas Wistar machos, adultos, cepa albina, con peso entre 299-555 gramos, los cuales fueron divididos en 20 grupos de experimentación y un grupo control cada uno con dos biomodelos. El estudio se llevó a cabo en tres fases. En la fase I, se anestesió el biomodelo para inducir isquemia mediante torniquete neumático. Se utilizaron dos dispositivos, uno se colocó en la extremidad anterior derecha y el segundo, en la posterior izquierda; la presión que se manejó estuvo en los rangos de 260 mmHg a 280 mmHg, durante 1 y 3 horas. La reperfusión fue de una (1) hora, 16 horas, 24 horas, 2, 4, 8, 16, 24 y 32 días. Los biomodelos de los grupos de reperfusión recibieron en los siguientes cuatro días posteriores a la isquemia analgesia postquirúrgica con tramadol vía oral.

La fase II inicio con la eutanasia y la disección de los músculos sóleo y extensor radial largo del carpo de las cuatro extremidades. Cada músculo se secciono en tres partes las cuales fueron fijadas por congelación a -70°C ; los cortes se realizaron en criostato a -20°C . De cada bloque se obtuvo entre cinco a ocho cortes por placa. Las técnicas de tinción fueron NADH-TR, mATPasa pH 4.6, Tricrómica de Gomori modificada, y Hematoxilina-Eosina. En la fase III se adquirieron las imágenes 10x y 40x tomadas de cinco campos microscópicos al azar por cada corte. Las imágenes fueron introducidas al software de análisis de imágenes Image Pro Plus versión 7.0 para establecer las características morfométricas y los cambios en las fibras musculares y el conectivo intramuscular durante la reperfusión.

Se evidenciaron diferencias significativas al comparar una y tres horas de isquemia en el músculo extensor radial largo del carpo, en las variables área que

ocupan las fibras musculares, infiltración celular en el conectivo, cambios en el tamaño celular y presencia de necrosis. Por otra parte, en el músculo sóleo, las diferencias al comparar los períodos de reperfusión seguidos a una y tres horas de isquemia, se presentaron en las variables, área que ocupa la matriz extracelular intramuscular, distribución de fibras oxidativas, presencia de fibras circulares, cambios en el tamaño celular y cambios en el citoplasma. También se encontraron diferencias en ambos músculos al comparar entre sí, los períodos de reperfusión en una hora y en tres horas de isquemia.

En cada tipo de músculo, según sea su predominancia, se presentan cambios por reperfusión desde una hora de isquemia. Aunque las lesiones son reversibles y se observen signos de regeneración celular en los periodos prolongados de reperfusión, hay una susceptibilidad tanto en los miocitos como en el tejido conectivo intramuscular, que genera los cambios en el patrón histológico normal descritos en este estudio.

2. Introducción

La asociación celular que se requiere para que un tejido realice sus procesos moleculares y fisiológicos adecuadamente, implica no sólo la integridad de las células que lo conforman, sino también la organización con su matriz extracelular. Tal constitución puede verse afectada por factores medioambientales inducidos o no, que generan cambios inicialmente de lesión y luego de adaptación o de muerte celular, según sea el tiempo de exposición al daño. En el caso de las lesiones reversibles, las respuestas que se generan para modificar en el tejido algunas de sus características normales, aseguran de manera eficiente su sobrevivencia al mecanismo de alteración.

El tejido muscular estriado esquelético conformado por los miocitos esqueléticos y con el conectivo intramuscular que le provee estabilidad mecánica durante la contracción y el desplazamiento, es capaz de adaptarse a lesiones reversibles inducidas como la isquemia, frente a la cual genera cambios durante la reperfusión. Se considera que la capacidad de regeneración del tejido mediante la diferenciación celular a partir de las células satélites, permite la recuperación del tejido en las primeras dos semanas de reperfusión; sin embargo, se ha visto que esta recuperación es parcial y que aún en períodos más prolongados hasta cuatro semanas, aún se presentan cambios tanto de regeneración celular, como de aumento en la proporción de la matriz extracelular intramuscular o el espacio que esta ocupa, de acuerdo con el tiempo de isquemia al que el músculo fue expuesto.

De la misma manera, los cambios en la predominancia de las fibras continúa siendo un aspecto que llama la atención de los investigadores en músculo esquelético, así como la tolerancia de determinados tipos de fibras frente a la isquemia y la reperfusión.

En el presente estudio, se establecieron cuatro grupos de variables que incluyen el área que ocupan las fibras musculares, el área que ocupa la matriz extracelular intramuscular, la predominancia de las fibras musculares en isquemia y reperfusión y los cambios de lesión en los que se encuentran las alteraciones en los miocitos y en el tejido conectivo que los rodea. Se realizó la comparación entre los períodos de reperfusión que siguieron a una y tres horas de isquemia, tanto en el músculo extensor radial largo del carpo como el sóleo y se determinaron los casos en los que las diferencias fueron significativas.

3. Problema de investigación

Múltiples estudios describen los cambios en las fibras musculares en períodos cortos y prolongados de isquemia, así como en periodos de reperfusión hasta 14 días; en este estudio se incluyó el análisis morfométrico tanto de la variabilidad de las fibras, como los cambios del tejido conectivo intramuscular y su relación con los miocitos, ya que es a través de este tejido que se da la organización de vasos sanguíneos y ramificaciones nerviosas hacia el músculo esquelético, de ahí la importancia de conocer las consecuencias que generan los procesos inducidos de isquemia-reperfusión en ambos tejidos.

La pregunta de investigación planteada corresponde a ¿Cuáles son los cambios histoquímicos y morfométricos que presentan tanto las fibras glucolíticas, intermedias y oxidativas, como el tejido conectivo intramuscular, en los músculos sóleo y extensor radial largo del carpo, al ser sometidos a períodos cortos de isquemia de una (1) y tres (3) horas y de reperfusión de una (1) hora, 16 horas, 24 horas, 2, 4, 8, 16, 24 y 32 días?

4. Justificación

Los periodos cortos de isquemia se producen principalmente en dos situaciones; la primera, corresponde a la cirugía ortopédica, relacionada con intervenciones del sistema musculo-esquelético, entre ellas, artroscopias de rodilla, tobillo, muñeca en las que el intervalo de tiempo que puede requerir determinado procedimiento, se encuentra entre 15 minutos a 60 minutos (Hocker et al., 2013); reparación de contracturas por quemaduras, reemplazos o revisión de articulaciones (McEwen, 2013); pues solo mediante la colocación de un torniquete neumático por encima del nivel a intervenir, se garantiza un campo operatorio adecuado.

La otra situación se presenta en el caso de accidentes o lesiones traumáticas ocurridas en lugares remotos, en los que el acceso a asistencia médica puede tomar al menos tres horas de viaje, para lo cual es útil un torniquete manual. En ambas situaciones, los tejidos localizados por debajo del nivel de compresión soportan los efectos de la isquemia seguido de las consecuencias de la reperusión.

En la revisión bibliográfica se encuentra gran cantidad de estudios que muestran que los músculos esqueléticos toleran bien periodos de isquemia hasta de seis horas cuyo factor determinante en el grado de lesión, es el tipo de fibras que predomine (Walters, Kragh, & Baer, 2008). Entre los estudios sobre cambios secundarios a isquemia en periodos menores a seis horas se pueden mencionar los realizados por Rácz & Illyés en 1997 (Rácz, Illyés, Sarkadi, & Hamar, 1997), en los que describen los cambios que se presentan en las fibras sometidas a dos y tres horas de isquemia. Posteriormente, Carmo-Araujo y colaboradores en 2007 muestran evidencias sobre cambios secundarios a periodos de isquemia menores a seis (6) horas (Carmo-Araújo, Dal-Pai-Silva, Dal-Pai, Cecchini, & Anjos Ferreira, 2007); y en 2008, Walters TJ, Kragh JF & Baer DG, describen los cambios que se presentan 14 días después de reperusión en cada tipo de fibra.

Todos los estudios mencionados revisaron exclusivamente la fibra muscular y no el tejido conectivo relacionado con los miocitos. Consideramos que esta descripción y análisis es fundamental puesto que es mediante este tejido que el miocito recibe la irrigación e inervación, de tal forma que cualquier alteración en su constitución impacta sobre los procesos de nutrición y respuesta al estímulo nervioso. Las técnicas histoquímicas, y el análisis morfométrico planteado en el presente trabajo, permitieron mayor precisión en la descripción de los cambios

durante isquemia, así como el seguimiento en cada período de reperfusión una vez se liberó el torniquete.

La propuesta de emplear un modelo animal resulta de la dificultad ética y científica para acceder a muestras obtenidas en individuos humanos; no obstante, la rata Wistar es un adecuado modelo animal dadas las semejanzas morfo-fisiológicas de las fibras musculares descritas en la literatura.

5. Marco teórico y estado del conocimiento

5.1. Desarrollo embrionario

A finales de la tercera semana del desarrollo intrauterino, durante el proceso de gastrulación, células mesoblásticas migran hacia las crestas laterales de la notocorda y se agrupan en dos columnas longitudinales para dar origen al mesodermo para-axial; simultáneamente, otro grupo de células migra hacia la región medial generando el mesodermo intermedio y otras, se ubican en la región más periférica formando el mesodermo lateral. El mesodermo para-axial da lugar a los somitas. En su interior, las células migran hacia los bordes dorsomedial y ventrolateral del somita, formando los precursores de las células musculares o mioblastos. Por otra parte, las células ubicadas en la región medial forman el dermatoma. Las células precursoras de músculo dan lugar a células mesenquimales nuevamente, que migran bajo el dermatoma para generar el dermomiótoma. De acuerdo con Buckingham et al., 2008, la diferenciación de los mioblastos, depende de la activación de los factores determinantes miogénicos MyoD y Myf5 a través de señales provenientes de los tejidos circundantes como la presencia de Miogenina y factores de transcripción como el factor potenciador de los miocitos 2-Mef2 (Buckingham & Montarras, 2008) (Fong & Tapscott, 2013) (Lo, Jiang, Gagnon, Nelson, & Laurencin, 2014).

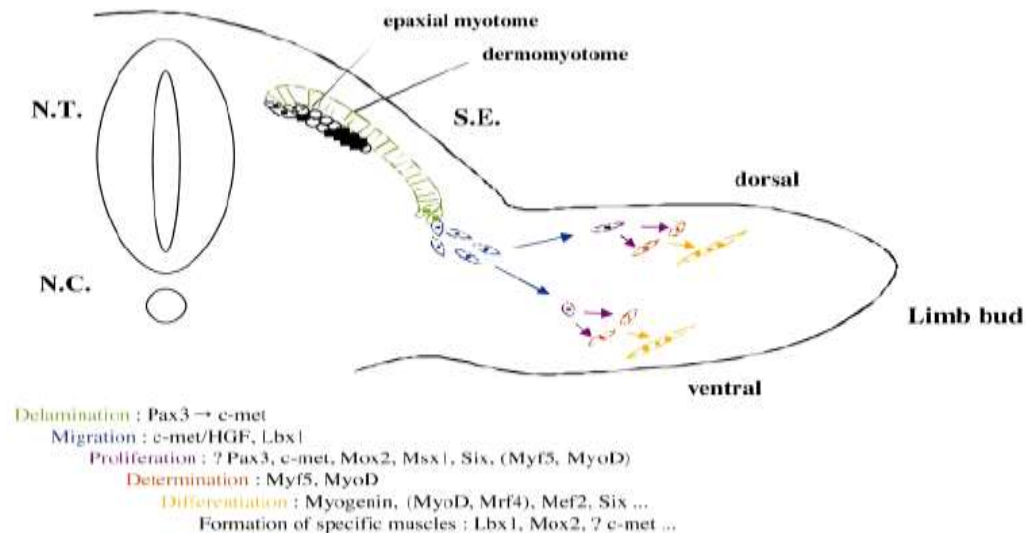


Figura 1. Representación esquemática de la formación de fibras musculares esqueléticas durante el desarrollo intrauterino. Tomado de(Buckingham et al., 2003).

Durante la diferenciación, los mioblastos se fusionan y forman fibras musculares largas y multinucleadas. Se desarrollan las miofibrillas en el citoplasma y, hacia el final del tercer mes de gestación, las estriaciones características del músculo esquelético se hacen evidentes. Estas se definen como fibras musculares primarias. Por otra parte, algunos mioblastos no se fusionan para formar fibras primarias, sin embargo, continúan proliferando y diferenciándose para dar lugar a las fibras secundarias al fusionarse entre ellas; al inicio estas fibras son más pequeñas, delgadas, de longitud corta y se ubican rodeando las fibras primarias (Cossu & Biressi, 2005).

En estudios in vitro (Buckingham et al., 2003) se observó que los mioblastos se desprenden del miotoma y migran hacia el lugar en el que van a dar lugar a fibras primarias y secundarias. Este estado se conoce como delaminación y migración, procesos dados por la expresión de los factores paired box 3-Pax3 y el Protooncogen c-met, entre otros. Durante la formación del componente muscular esquelético de una extremidad, los mioblastos migran a diferentes velocidades; aquellos que migran, se fusionan primero y forman las fibras primarias, contribuyen a formar los músculos en los que predominan las fibras de contracción lenta u oxidativas; las fibras secundarias conformarán los músculos en los que predominan las fibras de contracción rápida o glucolíticas. Los músculos distales se desarrollan primero que los músculos proximales y las extremidades superiores, o anteriores en el caso de los roedores, se desarrollan primero que las inferiores, o posteriores (Buckingham et al., 2003).

A medida que se desarrollan las fibras primarias y secundarias, las células mesenquimales migran y se diferencian a fibroblastos por acción del factor de crecimiento transformante beta (TGF B) y el factor de crecimiento de los fibroblastos (FCF) principalmente. Los fibroblastos contribuyen a la formación del tejido conectivo que asocia cada fibra muscular, el endomisio; delimita los fascículos musculares, el perimisio y, rodea totalmente el músculo, el epimisio. Las tres estructuras constituyen la matriz extracelular o tejido conectivo intramuscular (Purslow, 2010)

5.2. Matriz extracelular intramuscular o tejido conectivo intramuscular

Está conformado por los componentes fibrilares y no fibrilares que están en íntima relación con los miocitos, los fascículos musculares y el músculo, los cuales presenta un balance dinámico entre síntesis, remodelación y degradación, de acuerdo con los requerimientos funcionales y los estímulos mecánicos o de lesión

al que el tejido muscular estriado esquelético se encuentra expuesto (Purslow, 2010). Entre las funciones que cumple el tejido conectivo se describen, dar soporte mecánico para los vasos sanguíneos y nervios, facilitar la transmisión de fuerza desde la fibra muscular a las fibras adyacentes, al fascículo y a la unión miotendinosa - hueso y, proveer respuesta elástica al músculo esquelético (Gao, Kostrominova, Faulkner, & Wineman, 2008). Tanto el endomisio como el perimisio juegan un papel importante en el desarrollo de masa muscular durante el crecimiento y en la estabilidad mecánica y química; el aumento en la proporción de fibras colágenas se da durante el envejecimiento. El endomisio (figura 2) consiste en una red delgada y continua de fibras colágenas que se distribuyen en varias direcciones e histológicamente se clasifica como tejido conectivo laxo. Mediante esta estructura se da la relación del conectivo con la lámina basal que se relaciona con el sarcolema, así como entre células y con los capilares continuos adyacentes a cada miocito esquelético. La presencia del tejido conectivo que asocia los miocitos entre sí, el endomisio, se observa principalmente en cortes transversales como una delgada capa de conectivo laxo, formado principalmente por fibras reticulares. Allí se localizan los capilares más pequeños y las ramificaciones neuronales finas, paralelos a la fibra muscular.

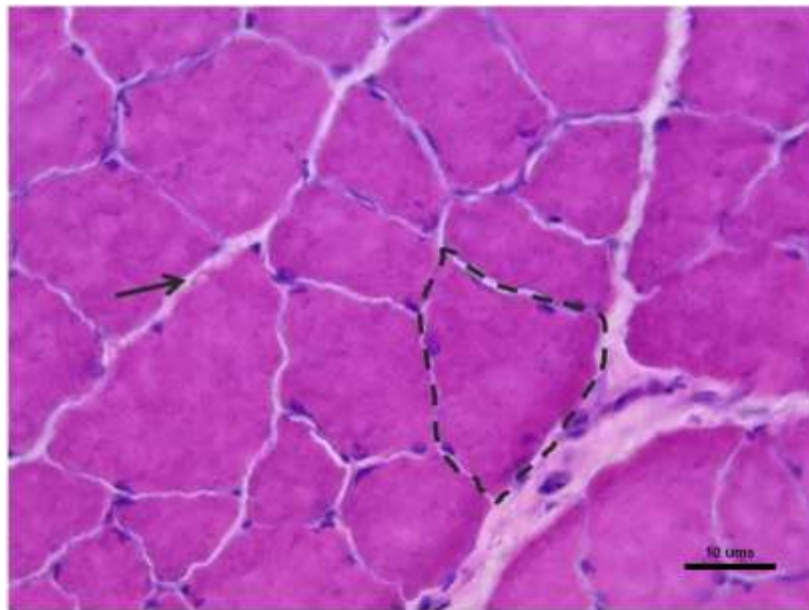


Figura 2. Preparado histológico en corte transversal del musculo soleo de rata Wistar macho. Imagen tomada en aumento 40x con software LASV3.8. Se observa una fibra muscular señalada con línea punteada y el endomisio indicado con flecha simple. Bar: 10 micras.

El perimysio consiste en fibras que siguen un patrón de ondulación uniforme observado por microscopía electrónica de superficie, cuya organización le permite adaptaciones a los cambios de longitud de las fibras, así como resistencia dado por la proporción de colágeno tipo I que presenta. Los fascículos musculares que constituye se clasifican como primarios, si son pequeños, indivisibles y rodeados por tejido conectivo laxo también denominado perimysio primario; y, fascículos secundarios, al estar formados por dos o más fascículos primarios y organizados mediante tejido conectivo moderadamente denso o denso irregular, conocido como perimysio secundario (figura 3). Este se detalla como una capa de un espesor mayor, con aumento de fibras colágenas que rodea la agrupación de fibras musculares que forman el fascículo (Fang, Nishimura, & Takahashi, 1999) (Purslow, 2010).

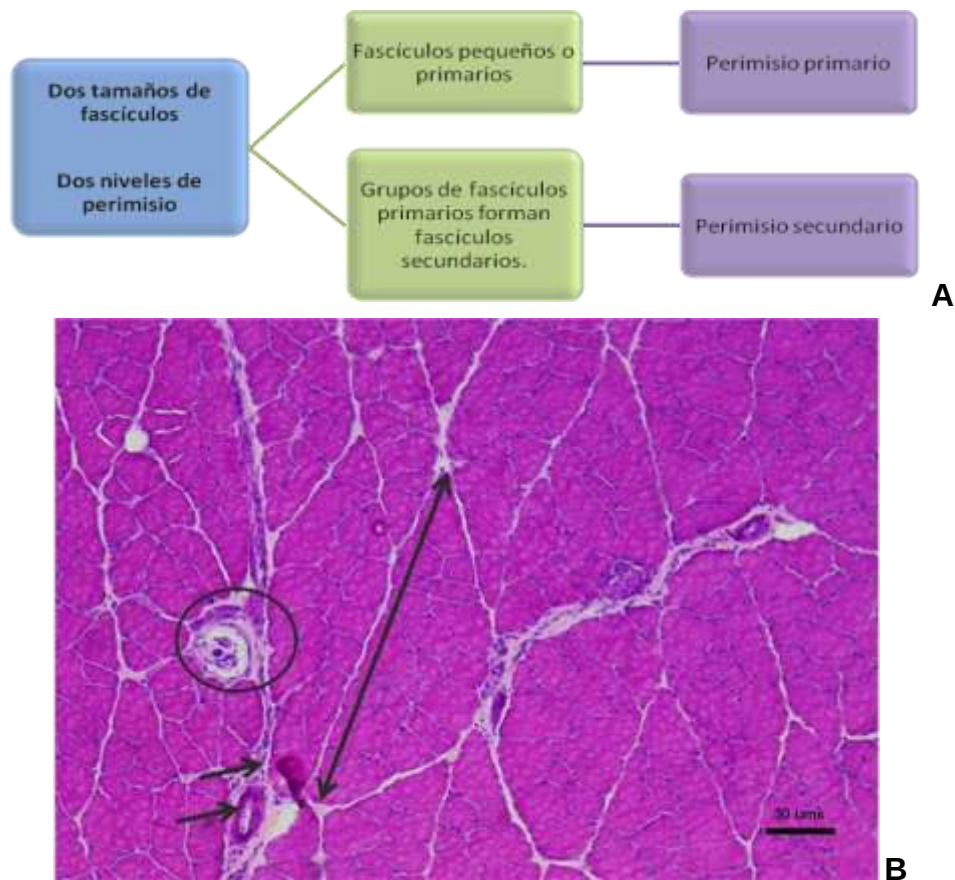


Figura 3. A. Organización de fascículos musculares en relación con el perimysio. B. Preparado histológico en corte transversal del musculo soleo de rata Wistar macho. Imagen tomada en aumento 10x con software LASV3.8. Se observa un fascículo muscular secundario señalado con la flecha doble, el perimysio secundario, sus vasos

sanguíneos indicados con flechas simples y el huso muscular dentro del círculo. Bar: 30 micras.

El epimisio rodea el músculo estriado esquelético en su totalidad y permite el ingreso de las ramificaciones de los grandes vasos sanguíneos hacia las fibras musculares.

Está constituido por una doble capa de fibras colágenas dispuestas de manera entrecruzada, que continúa con la fascia muscular superficial y a nivel de la unión musculo-tendinosa con el paratenon y el epitenon. Esta disposición le provee estabilidad mecánica para la transmisión de las fuerzas que recibe del perimisio hacia el resto del músculo y los tendones. A su vez, al formar el límite con el músculo adyacente, el conectivo permite no solo que los vasos sanguíneos y nervios transcurran en este espacio para ingresar a cada músculo, sino que les provee la capacidad de adaptarse y deformarse frente a los cambios que ocurren en los músculos durante el movimiento. (Purslow, 2010); (Turrina, Martínez-González, & Stecco, 2013); (Fang et al., 1999).

Estructura	Componentes	Referencia
Endomisio	Colágeno tipo III, IV, V, heparán sulfato	(Turrina et al., 2013) (Purslow, 2010) (Kjaer, 2004)
Perimisio	Colágeno tipo I, III, IV, V, VI, XII, condroitín, dermatán, heparán y queratán sulfato y decorín y agrecan	(Turrina et al., 2013) (Purslow, 2010) (Kjaer, 2004)
Epimisio	Colágeno tipo I, II, III, IV, V, VI, XII, XVIII y XIX, ácido hialurónico	(Turrina et al., 2013) (Purslow, 2010) (Kjaer, 2004)

Cuadro 1. Constitución molecular de la matriz extracelular intramuscular

Ambos, el perimisio y el epimisio, en términos generales se clasifican como tejido conectivo denso irregular.

5.3. Ultraestructura de las fibras musculares esqueléticas

La fibra muscular esquelética es una célula multinucleada altamente especializada en producir contracción, característica que permite a través de la asociación entre fibras dada por el tejido conectivo, transmitir fuerza y generar movimiento por el desplazamiento de segmentos corporales.

Los miocitos esqueléticos son cilíndricos, longitudinalmente observados, con un diámetro entre 10 y 100 μm y longitud variable que puede ir desde cinco milímetros hasta 35 centímetros, según el tamaño del músculo que conforman. El diámetro determina la fuerza y la longitud, la velocidad de contracción, así como, el desplazamiento de la fibra muscular, entendido como la distancia capaz de acortarse. La alternancia clara y oscura del citoplasma celular dada por la disposición de los miofilamentos.

Cada fibra muscular está rodeada por el sarcolema o membrana plasmática; si bien su estructura básica es similar a otras membranas plasmáticas, en el miocito esquelético se encuentran modificaciones en diferentes regiones, en especial a nivel de unión miotendinosa y neuromuscular. Está compuesta por el plasmalema, la membrana más interna en contacto con el sarcoplasma, cuyas invaginaciones dan lugar a los túbulos transversos; externa a ella y rodeándola se ubica la lámina basal, compuesta principalmente por colágeno tipo IV y laminina, así como proteoglucanos y glucoproteínas (Sanes, 2003).

Entre el plasmalema y la lámina basal, se encuentran las células satélites, importantes en la regeneración de las fibras musculares en lesión reversible. Son células mono nucleadas que aparecen en las extremidades hacia el día 17 después de la fecundación una vez las fibras primarias se han formado (Morgan & Partridge, 2003).

Su origen aún no está completamente definido, sin embargo, se establecen dos posibles alternativas. El primer origen potencial es el somita; durante el desarrollo embrionario células precursoras miogénicas migran hacia el compartimiento de formación de músculo esquelético las cuales permanecen inactivas en lugar de diferenciarse. El segundo origen potencial es el endotelio; células de origen hematopoyético migran hacia los vasos sanguíneos, las cuales pueden permanecer en el endotelio o diferenciarse hacia células satélite y trasladarse hasta el sarcolema (Fano, Di Tano, Parabita, Beltramin, & Mariggiò, 2004).

Durante la vida postnatal, las células satélites se desarrollan a una tasa más lenta. Muchas de ellas se fusionan a la fibra muscular adyacente contribuyendo a incrementar el tamaño de la misma. Al finalizar la etapa de crecimiento del ciclo vital del individuo, estas células permanecen inactivas y activarse en caso de daño muscular (Cossu & Biressi, 2005). En su estado inactivo, su núcleo contiene mayor proporción de heterocromatina que eucromatina. Si son activadas, cambian su morfología desarrollando prolongaciones citoplasmáticas, aumento en el volumen del citoplasma, cambio en la proporción heterocromatina/eucromatina y, organelas como el aparato de Golgi, mitocondrias y ribosomas aumentan en tamaño y número (Holterman & Rudnicki, 2005).

Se ha observado que la distribución de las células satélites no es equitativa entre los diferentes grupos de fibras musculares. Holterman et al, observaron que las fibras de contracción lenta poseen mayor número de células satélite en relación a las fibras de contracción rápida. Se cree que la concentración de capilares a lo largo de la fibra muscular y la unión neuromuscular influye en la elevada densidad de células satélites. Así mismo, es probable que el flujo sanguíneo provea células precursoras miogénicas (MPC) que contribuyen a mantener la concentración de células satélites inactivas alrededor de las fibras musculares.

En el sarcoplasma, se encuentran las miofibrillas formadas por grupos de sarcómeros dispuestos en serie. El total de sarcómeros depende de la longitud y el diámetro de la fibra muscular. Un músculo puede acortarse varios centímetros, a pesar de que cada sarcómero se acorta aproximadamente 1 μm , esto se debe a los filamentos gruesos de miosina, filamentos delgados de actina y proteínas de sostén importantes en la sarcomerogénesis como la titina, nebulina, alfa actinina, miomesina, proteína C y tropomodulina.

La distribución de las proteínas contráctiles se identifica por microscopía electrónica de luz polarizada y se describen como banda A, anisótropa a la luz polarizada, formada por los filamentos gruesos de miosina y delgados de actina; banda I, isotrópica a la luz polarizada, contiene los filamentos delgados. Ambas están limitadas por la línea Z. La banda A presenta una línea densa central conocida como línea M, formada por miomesina, encargada de alinear los filamentos gruesos junto con la proteína C. De la misma manera, en el sarcoplasma del miocito se encuentran el retículo sarcoplásmico liso y las mitocondrias, entre otras organelas. El glucógeno se encuentra almacenado en vacuolas y bajas concentraciones de calcio se hallan fuera del retículo sarcoplásmico. Los túbulos transversos son extensiones de la membrana

plasmática que envuelven las miofibrillas, están en contacto con el retículo sarcoplásmico a través de sus cisternas terminales formando la tríada. Este, se constituye como un retículo endoplasmático liso formado por un conjunto de membranas dispuestas rodeando cada miofibrilla y anclado a los túbulos transversos a través de sus cisternas terminales (Kaisto, 2003). Permiten el contacto del miocito con el espacio extracelular y participan en la propagación de los cambios en el potencial de membrana a lo largo de las fibras musculares. Está dividido en dos regiones, una longitudinal y otra de unión. A nivel del retículo sarcoplásmico longitudinal se encuentra la ATPasa de calcio cuya función es el bombeo de calcio del citoplasma al interior del retículo sarcoplásmico durante la relajación muscular y el mantenimiento de la concentración citosólica en reposo. Se han identificado dos isoformas para el músculo estriado esquelético y cardíaco; la isoforma SERCA 1 está presente en mayor proporción en las fibras de contracción rápida y la isoforma SERCA 2, se encuentra en las fibras de contracción lenta y en los cardiomiocitos. La región de unión consta del canal sensible a voltaje conocido como receptor de dihidropirimidina, el canal de liberación de calcio conocido como receptor de rianodina y la calsecuestrina. A través del canal sensible a voltaje se activa la vía de fosforilación que tiene como intermediario el cAMP y la fosfocinasa A. La fosforilación del receptor de rianodina disocia la calstabina, proteína inhibidora de receptor y en consecuencia se da la liberación del calcio al sarcoplasma el cual participa en el acople excitación-contracción. La calsecuestrina también es fosforilada para permitir la salida del calcio al sarcoplasma (Reyes–Juárez & Zarain–Herzberg, 2006).

Las mitocondrias se encargan de la producción de ATP a través del metabolismo aeróbico. Se encuentran localizadas a nivel subsarcolémico o intermiofibrilar, aspecto dado por la heterogeneidad de las fibras que conforman el músculo esquelético. Están conformadas por dos membranas. La membrana externa mitocondrial contiene los receptores de comunicación con el sarcoplasma; en la membrana interna mitocondrial se encuentran los complejos proteicos que hacen parte de la cadena de transporte de electrones, entre los que se encuentran NADH, coenzima Q, FADH, GADPH y citocromos. La producción de ATP es activada, entre otros factores, por la concentración de ADP en citoplasma, siendo las fibras glucolíticas más sensibles al ADP que las oxidativas (Gueguen, Lefaucheur, Fillaut, & Herpin, 2005).

La densidad mitocondrial depende del tipo de fibra muscular; en fibras musculares con capacidad oxidativa puede llegar a ocupar un 20% del volumen citoplasmático.

Durante el proceso de fosforilación oxidativa se producen radicales libres de oxígeno, en especial anión superóxido a nivel de los complejos FADH y coenzima Q (Sivitz & Yorek, 2010). La matriz mitocondrial contiene el ADN mitocondrial y las enzimas que oxidan piruvato y ácidos grasos en Acetil CoA que ingresa a la cadena de transporte de electrones.

La glicólisis anaeróbica ocurre en el citoplasma teniendo como precursores principales fosfocreatina, gliceraldehído 3-fosfato, piruvato y glucosa. A través de la vía lactato deshidrogenasa presente en el espacio intermembrana, es producido lactato y NAD⁺. NAD⁺ ingresa al metabolismo aeróbico, en el caso del ejercicio de alto rendimiento, generando un acople entre la producción aeróbica y anaeróbica de energía (Baker, McCormick, & Robergs, 2010). Según el estudio realizado por Jacobs et. al (2013), las mitocondrias presentes en los miocitos esqueléticos humanos, también tienen la capacidad de oxidar lactato a piruvato mediante el complejo de oxidación de lactato, para ingresar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos; este complejo no se encuentra presente en el músculo esquelético de la rata (Jacobs, Meinild, Nordsborg, & Lundby, 2013).

Los procesos de angiogénesis y vasculogénesis del músculo estriado esquelético están mediados por la expresión de factores producidos por los mioblastos durante el ensamblaje de las fibras musculares y su componente contráctil. Degenfeld et. al. en 2003 encontraron expresión de factores de crecimiento y maduración como el factor de crecimiento vascular endotelial-VEGF, la molécula de adhesión vascular celular-VCAM, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas-PDGF, angiopoyetina-1 y TGF- β , estos productos contribuyen a la generación de un vaso sanguíneo maduro por medio de inducción de la proliferación, migración y adhesión de las células endoteliales, así como el equilibrio entre ellas para la formación de ramificaciones que dan lugar a los capilares (von Degenfeld, Banfi, Springer, & Blau, 2003).

5.4. Clasificación de las fibras musculares

De acuerdo al tipo de contracción que generan, las fibras tipo I o de contracción lenta, poseen la isoforma MCH I. Generan contracciones prolongadas y de menor fuerza.

Las fibras tipo IIa o de contracción intermedia, poseen la isoforma MHC IIa. Las fibras tipo IIb o de contracción rápida, poseen la isoforma MHC IIb. Generan contracciones cortas y de mayor fuerza.

Metabólicamente, la fibra muscular se clasifica según la actividad enzimática que presenta (figuras 4 y 5). En algunos estudios realizados con la enzima miosina ATP-asa (Adenosín trifosfatasa) y NADH-TR (nicotinamida adenina tetrazolium

reductasa), se relacionó las fibras de contracción rápida con el metabolismo glucolítico, las intermedias con metabolismo glucolítico y oxidativo y las de contracción lenta con metabolismo oxidativo (de Freitas, Freitas, Lopes, Pai-Silva, & Piçarro, 2009).

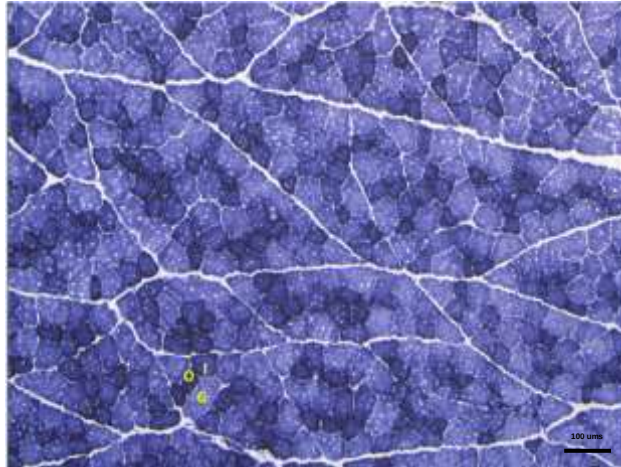


Figura 4. Distribución de los tres tipos de fibras en tinción NADH-TR, músculo extensor radial largo del carpo de rata Wistar. O: fibra oxidativas, G: fibra glucolítica, I: fibra intermedia.10X. Bar: 100 micras.

La mioglobina, proteína encargada del transporte de oxígeno en el músculo, se encuentra en mayor concentración en las fibras con metabolismo oxidativo, ya que estas fibras tipo I contienen mayor proporción de capilares de tipo continuo y ramificaciones nerviosas.

5.5. Músculos extensor radial largo del carpo y sóleo

En el músculo extensor radial largo del carpo, glucolítico, predominan fibras de contracción rápida. En humanos y roedores se ubica en la región posterior del antebrazo superficialmente. Se origina en el tercio inferior del borde lateral del húmero y su inserción se encuentra en la superficie dorsal de la base del segundo metacarpiano. Su inervación está dada por C6 y C7 y su función se relaciona con extensión del puño y abducción de la mano.

El músculo sóleo, oxidativo, tiene predominancia de fibras musculares de contracción lenta. En humanos y roedores se localiza en la cara posterior de la pierna por debajo del gastrocnemio. Se origina en la línea del músculo sóleo en el tercio medio del borde medial de la tibia y en el tercio superior de la cara posterior de la fíbula. Se inserta en el tercio medio de la cara posterior del calcáneo y junto con el gastrocnemio forma el tendón de Aquiles.

En las ratas, la ubicación y la relación con los músculos que rodean al extensor radial largo del carpo y al sóleo son muy similares a la anatomía humana, así mismo sus funciones. Las diferencias se observan en cuanto a proporción de masa muscular dado por la postura normal que adopta el roedor lo que influye en la distribución del peso corporal.

La irrigación proviene de la arteria tibial posterior rama de la arteria poplítea y la inervación está dada por ramas del nervio tibial cuya raíces están a nivel de S1 y S2 y que entran en la superficie muscular profunda a nivel de su tercio proximal. La función del sóleo consiste en la flexión de la pierna y el pie.

Estudios realizados por Rivas et. al 2011, en los que compararon las características del sóleo y el extensor radial largo del carpo, encontraron que la proporción de mitocondrias en las fibras oxidativas es mayor que en las glucolíticas, sin embargo, cuando estas últimas han sido sometidas al ejercicio físico pueden aumentar su concentración hasta alcanzar niveles similares a los de las fibras oxidativas. De la misma manera, la vascularización en el sóleo es mayor que en el músculo extensor, por tanto su concentración de mioglobina, glucógeno y triglicéridos es más elevada (Rivas et al., 2011).

Camillo et. al, 2004, describen que la vascularización y la inervación en el músculo sóleo son determinantes en su concentración de células satélite. La denervación es un factor que incrementa la migración de células satélite, así como su diferenciación en miocitos que se fusionan y forman nuevas fibras musculares. El estímulo nervioso es requerido para que la función continúe, por lo que seis meses posterior a la denervación, tanto la migración como la diferenciación disminuyen y desaparecen (Camillo, Rocha, & Chopard, 2004).

Las reacciones histoquímicas como m-ATPasa permiten determinar el porcentaje de fibras tanto glucolíticas como oxidativas en un determinado músculo (figura 5). De acuerdo con Soukup T., Zacharová G., & Smerdú V. 2002, el músculo sóleo en ratas consta con un porcentaje de fibras tipo I y tipo IIa de 96.1% $\pm$ 2.9. Por otra parte, el extensor radial largo del carpo de ratas contiene 75.5% $\pm$ 2.2 de fibras tipo IIb, 5.5% $\pm$ 1.0 de fibras tipo I y 18.8% $\pm$ 1.7 de fibras tipo IIa. Estos valores pueden tener ligeras variaciones en los porcentajes dependiendo de la raza del biomodelo (Soukup, Zacharová, & Smerdu, 2002).

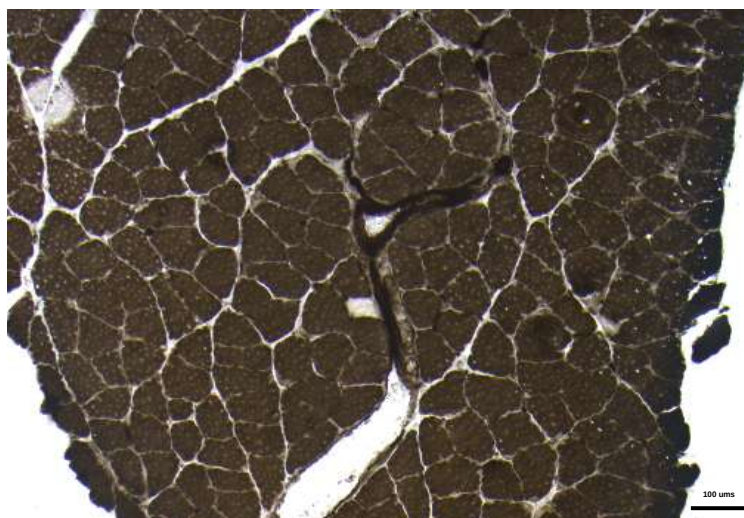


Figura 5. Predominancia oxidativa en músculo sóleo de rata Wistar evidenciado por histoquímica enzimática para mATPasa pH 4.6. 10X. Bar: 100 ums.

El huso muscular, es una estructura presente en los músculos esqueléticos, visible a la microscopía óptica que está conformado por fibras aferentes, eferentes y fibras intrafusales que tienen un menor tamaño que el resto de los miocitos (fibras extrafusales). Esta estructura junto con el órgano tendinoso de Golgi aporta información a los nervios periféricos sobre la tensión y fuerza de contracción del músculo esquelético.

5.6. Torniquete neumático

La técnica de isquemia inducida a través de torniquete, ha sido ampliamente usada en modelo animal, especialmente en ratas, ratones y conejos. Este procedimiento es muy similar al usado en procedimientos quirúrgicos ortopédicos con el fin de realizar análisis histológicos, farmacológicos y fisiológicos tanto en fibras glucolíticas como oxidativas. De acuerdo con el tipo de estudio a realizar, es posible seleccionar para la realización de la investigación un torniquete de goma rodeando la extremidad de la cual será extraído el músculo, como es el caso de los estudios farmacológicos o de pre acondicionamiento isquémico para determinar la capacidad de adaptación muscular a la reperusión (Souza Filho et al., 2009). Sin embargo, estudios que requieren control de la presión de isquemia, deben contar con un sistema de brazalete y manómetro conectados a la fuente de insuflación. Este sistema de inflación a una determinada presión, fue utilizado por primera vez en 1904 por Harvey Cushing como un dispositivo en las cirugías de las extremidades.

Una de las principales complicaciones de las cirugías ortopédicas con el uso del torniquete es el tromboembolismo pulmonar, en especial si el paciente presenta factores de riesgo como trombosis venosa profunda, antecedentes personales de cáncer o alteraciones cardiovasculares. El protocolo previo a la colocación del brazalete consiste elevar la extremidad superior a 90° durante 5 minutos o la inferior a 45° por 5 minutos, según la extremidad a intervenir, sin aplicar presión mientras se realiza la antisepsia y el vendaje con elementos estériles. Esto se conoce como exanguinación de la extremidad.

Tanto la piel, músculos, nervios y vasos sanguíneos presentan lesiones no sólo por la isquemia inducida, sino por la fuerza de presión mecánica de distribución asimétrica bajo el brazalete. Un método práctico es aplicar 75-100 mmHg por encima de la presión arterial sistólica. Es importante la oclusión tanto del flujo arterial como venoso a fin de evitar el edema secundario a congestión venosa.

5.7. Cambios de lesión y regeneración en el músculo esquelético y la matriz extracelular intramuscular causados por isquemia y reperfusión

El término isquemia se define como una interrupción del flujo sanguíneo arterial, que conlleva a la disminución del suministro de oxígeno a los tejidos y afecta la síntesis de ATP a través del metabolismo aeróbico, por lo que debe ser producido de manera menos eficiente mediante el metabolismo anaeróbico.

Los efectos dependen de diversos factores, tales como: (1) la duración, (2) la intensidad de la isquemia, (3) la rapidez con que se instala, (4) el grado de sensibilidad de los tejidos y (5) la disposición anatómica del árbol vascular (Carden & Granger, 2000).

La oclusión puede provocar vasoespasmo intenso distal, seguido de trombosis; según el grado de inmovilización y pérdida de la función endotelial, se extiende y obstruye la circulación lo que agrava la isquemia. Al mismo tiempo, una trombosis venosa profunda puede ocurrir como resultado de la hipoxia y el flujo venoso lento. La intensidad de la lesión isquémica depende del nivel de oclusión, la circulación colateral y el grado de la demanda tisular de oxígeno. Así, el tiempo de isquemia es un factor crucial en la determinación de la intensidad de las lesiones y la viabilidad del tejido. Las células muestran diferentes tiempos de sobrevida a la isquemia. Las neuronas mueren luego de cinco (5) minutos, los miocitos cardiacos pueden resistir hasta 30 minutos, las células renales hasta 1 hora y las células musculares esqueléticas entre 3 y 6 horas (Carmo-Araújo et al., 2007).

Las consecuencias de la isquemia pueden ser: ninguna, necrosis electiva parenquimatosa, infarto o atrofia, según como se den los factores indicados (Blaisdell, 2002). Los efectos funcionales de la isquemia incluyen alteraciones en la contracción muscular después de 2 horas de isquemia seguido de 2 horas de perfusión en ambos tipos de fibras; así mismo después de 3 horas de isquemia los niveles de ATP descienden en un 48% en los músculos con predominio oxidativo más que en el glucolítico (Carvalho, McKee, & Green, 1997).

La isquemia causa lesión celular que puede ser reversible o irreversible. En las lesiones reversibles la célula es capaz de recuperarse después de sufrir un evento isquémico durante un determinado período de tiempo. Lo contrario sucede en las lesiones irreversibles. En las lesiones reversibles se ve afectada inicialmente la fosforilación oxidativa y la respiración aeróbica de la célula, seguido de disminución en la producción de ATP. La disminución de la síntesis de ATP mitocondrial y la reducción de la función de la ATPasa dependiente de calcio genera aumento en las concentraciones intracelulares de calcio, activación de fosfolipasas que producen daño en las organelas. Estos cambios se acentúan después de tres a cuatro horas de isquemia (Itoh & Kudoh, 2011). Posteriormente, se reduce la actividad de la bomba sodio/ potasio con la subsecuente acumulación de sodio en el interior de la célula, incrementando la concentración de agua que conlleva a tumefacción celular y dilatación del retículo endoplásmico. Así mismo, la carga osmótica de la célula aumenta debido a la acumulación de catabolitos, entre ellos, fosfatos inorgánicos y lactato. Entre las patologías que causan isquemia se encuentran la enfermedad arterial periférica oclusiva, la deformación por presión prolongada que conlleva a úlceras, la cirugía ortopédica que implica la utilización de un torniquete y durante los trasplantes que contienen tejido muscular esquelético. En estas condiciones, la respuesta frente a la isquemia involucra respuesta inmune, principalmente aumento en la concentración de mediadores inflamatorios con efecto quimiotáctico, evento que aumenta la migración de leucocitos y neutrófilos que se adhieren al endotelio y liberan sus enzimas proteolíticas leucocitarias como mieloperoxidasas y colagenasas produciendo lesión del endotelio y posterior obstrucción de la microcirculación, aspecto que empeora la isquemia (Da Silveira & Bonneti, 2004). Ambas respuestas generan peroxidación de lípidos, desintegración de la membrana celular, alteración en la integridad endotelial y aumento en la permeabilidad capilar, muerte celular y daño del tejido. La actividad metabólica baja en reposo, la reserva de glucógeno, la concentración de fosfatos de alta energía en forma de creatina y la capacidad para mantener las funciones de base celular a través de glucólisis anaeróbica permite al tejido muscular una mayor

resistencia a la isquemia. En las primeras horas de isquemia, los cambios bioquímicos de las funciones celulares básicas son reversibles. Sin embargo, cuando la isquemia se prolonga por un período mayor a cinco horas, otra secuencia de reacciones se produce y conlleva a la disminución excesiva de la energía de la célula y muerte celular (Da Silveira & Bonneti, 2004). Carmo-Araújo et. al, 2007 describen que el músculo esquelético sometido a cuatro (4) horas de isquemia, presenta cambios en el diámetro de las fibras musculares y diferentes intensidades de reactividad a las pruebas de NADH-TR y ATP asa, según el tipo de fibra muscular (Carmo-Araújo et al., 2007).

La reperfusión ocurre cuando el flujo sanguíneo retorna a un tejido después de un periodo de isquemia. Aunque permite la recuperación del tejido, al limitar la necrosis post-isquémica, se ha descrito que la reperfusión puede en si misma lesionar los tejidos, ocasionando la “lesión por reperfusión” y en ocasiones la necrosis por reperfusión. Los vasos sanguíneos de mediano calibre se encuentran dilatados mientras que en la microcirculación hay vasoconstricción, lo que tiende a aumentar la isquemia y los cambios de lesión (Saltzman et al., 2013). Los efectos de la lesión por reperfusión dependen, entre otros, de los daños causados por la isquemia y del grado de sensibilidad de cada tejido. Se conoce que el daño se debe en parte a la respuesta inflamatoria que se produce en los tejidos afectados por la isquemia. De acuerdo con el estudio realizado por Ghaly & Marsh (2010) se genera un aumento en la concentración de neutrófilos, su actividad mieloperoxidasa y los factores quimiotácticos, durante las primeras horas posteriores a isquemia, con disminución gradual en los siguientes tres días; la infiltración monocitaria aumenta así como la actividad oxidativa de los macrófagos (Ghaly & Marsh, 2010). Los leucocitos que entran al tejido durante la reperfusión liberan interleuquinas y radicales libres (hidroxilo, superóxido, entre otros) en respuesta al daño tisular producido por la isquemia. Las interleuquinas promueven la respuesta inflamatoria y los radicales libres tienden a dañar las proteínas celulares, el ADN y la membrana plasmática de las células que sobrevivieron a la isquemia (Ma, Qi, & Chen, 2008). La muerte celular induce la liberación de más radicales libres. La inflamación, si se vuelve crónica, puede finalmente reproducir la isquemia, por extravasación de fluidos y estasis sanguíneo (Carden & Granger, 2000). Esta inflamación se hace evidente en microscopía óptica por edema tanto de las fibras musculares como a nivel del conectivo, aumento de los espacios que ocupan el endomisio y perimisio, alteración en el patrón histológico normal e infiltración celular (Loerakker et al., 2011).

En relación con los monocitos, estos se diferencian hacia uno de dos tipos de macrófagos en el conectivo; los macrófagos tipo I inducidos por interferón gamma (IFN- γ) con funciones proinflamatorias, se encargan de la producción de radicales libres de oxígeno, interleuquina 1 y 6 (IL-1 y 6) y factor de necrosis tumoral (TNF); se asocian a necrosis muscular. Por otra parte, los macrófagos tipo II producen IL 4, 10 y 13, promueven la reparación celular y se relacionan con los procesos de regeneración del tejido muscular estriado esquelético lesionado. En roedores se ha evidenciado que los macrófagos tipo I promueven la proliferación de células precursoras miogénicas, mientras que los macrófagos tipo II estimulan la diferenciación celular y la fusión de mioblastos (Brunelli & Rovere-Querini, 2008; Saclier, Cuvellier, Magnan, Mounier, & Chazaud, 2013).

Además del daño de la membrana celular, edema, disfunción microvascular y necrosis muscular asociados con procesos de morbilidad y disfunción definitiva del tejido muscular (Blaisdell, 2002) que produce la reperusión, a nivel metabólico se ha descrito una reducción gradual de los depósitos energéticos intracelulares de trifosfato de adenosina (ATP), de fosfocreatina, de glucógeno muscular, con aumentos en las concentraciones intracelulares de hidrogeniones y de lactato (Carvalho, McKee, & Green, 1996). El estrés oxidativo evidenciado mediante biopsias musculares humanas, se presenta también en el retículo sarcoplásmico por disminución en la fosforilación de la molécula 4E-BP1 por AKT, ambas involucradas en la síntesis de proteínas, en las alteraciones en la movilidad de calcio, la entrada de glucosa al tejido y la glucólisis, así como la activación de caspasa 3, principalmente durante la reperusión (Hocker et al., 2013) (Deldicque, Hespel, & Francaux, 2012). Se ha reportado que este fenómeno induce en el músculo esquelético condiciones de hipoxia, hipercapnia y acumulación a nivel extracelular de metabolitos como ATP, adenosina, protones, lactato, hipoxantina y colina, entre otros (Korth et al., 2000); (Mense, 2009). Se da la expresión de genes como HIF1B (factor 1B inducible por hipoxia), CASP-8 (caspasa 8) para la activación de la vía extrínseca de la apoptosis, IL-8 (interleuquina 8), mediador de la respuesta inflamatoria y PLAUR (receptor de uroquinasa activado por plasmina), en la reorganización tisular durante los cambios de lesión que ocurren tanto en las fibras musculares como en el conectivo (Wiendl, Hohlfeld, & Kieseier, 2005); (Dragu et al., 2011).

En condiciones normales la NADPH (nicotinamida adenina dinucleotido fosfato), funciona como un aceptor de electrones en el proceso de respiración celular mediado por la xantina deshidrogenasa. Durante la reperusión, la xantina se convierte en oxidasa y utiliza iones oxígeno para la síntesis de radicales libres. La

formación de altas concentraciones de radicales libres a través del sistema xantina oxidasa en los neutrófilos que migran al tejido lesionado por quimiotaxis, produce un daño mayor de la membrana plasmática, incremento de la respuesta inflamatoria y el consecuente edema tisular, generando alteraciones locales y sistémicas (Da Silveira & Bonneti, 2004) (Chondrogianni et al., 2014).

Las características histológicas del músculo esquelético sometido a cuatro (4) horas de isquemia y una (1) hora de reperfusión corresponden a edema, disminución en el diámetro de las fibras o hipercontractilidad, y necrosis; sometidas a pruebas de NADH-TR (nicotinamida adenina dinucleótico tetrazolium reductasa) y mATPasa (miosina adenosin trifosfatasa), varias de las fibras evidenciaron reactividad moderada o débil (Carmo-Araújo et al., 2007).

Mars y Gregory en 1991 evidenciaron que después de 90 minutos de isquemia inducida con torniquete y 3 horas de reperfusión el 29% de fibras tipo I presentan aumento en el tamaño en relación con el 7% de fibras tipo IIa y 5% de fibras tipo IIb; la distancia entre las fibras aumenta durante la reperfusión en el 48% de las fibras analizadas (Mars & Gregory, 1991).

Estudios en donde se comparó la respuesta del músculo vasto y del sóleo sometidos a 2 horas de isquemia y 0 a 6 horas de reperfusión mediante el uso de marcadores inmunohistoquímicos para IgM y C3 mostraron que el depósito de C3 predomina en las fibras de contracción rápida del músculo vasto presentando el 28% +/- 12.4 de fibras lesionadas comparado con el sóleo, el cual presentó el 17.3 +/- 11.8 de fibras alteradas (Chan et al., 2004).

Walters, et al., en 2008, afirman que el tipo de fibras que predomina en el músculo influye en la recuperación de la lesión inducida por isquemia y reperfusión. Los músculos con predominancia de fibras glucolíticas (plantar) sometidos a dos (2) horas y cuatro (4) horas de isquemia y 14 días de reperfusión evidenciaron al inicio entre el 45% y 69% de pérdida de su capacidad contráctil. El sóleo no perdió su capacidad contráctil en el grupo de 2 horas isquemia, sin embargo, en el de cuatro (4) horas perdió el 30% de su capacidad, presentando recuperación el día 14 (Walters et al., 2008).

Isquemia de tres horas es un periodo crítico en el que el músculo sufre daño, sin afectar severamente su capacidad de regeneración. En las isquemias de cuatro horas, el tejido muscular estriado esquelético es susceptible a necrosis en un 30% y puede llegar a ser un 90% si la isquemia se prolonga hasta cinco horas. La denervación previa sea química o quirúrgica aumenta en cierto grado la tolerancia

a isquemia de cuatro horas y reperfusión (Küçüker et al., 2012), al igual que la administración de medicamentos antes de la colocación del torniquete.

Otro de los estudios en los que se evalúa la recuperación de ambos tipos de fibras en períodos prolongados de reperfusión es el realizado por Woitaske MD & McCarter RJ.1998, en el que observaron que la recuperación morfológica en las fibras tipo II se da a un ritmo más lento que en las fibras tipo I después de 7 y 14 días de isquemia (Woitaske & McCarter, 1998).

Los cambios que se generan en la matriz extracelular intramuscular secundarios a lesión, implican la degradación y síntesis tanto del componente fibrilar (fibras colágenas y elásticas) como no fibrilar (glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glucoproteínas), en los que el incremento en la concentración de metaloproteinasas (MMP) es uno de los principales aspectos. Estas proteínas, así como sus inhibidores tisulares (TIMP), presentan un aumento en la expresión por parte de células miogénicas in vitro, tales como MMP 1, 2, 3, 7, 9, 10, 14 y 16, relacionadas con la migración de mioblastos y en la formación de los miotubos, por tanto, en la regeneración del tejido muscular. La MMP 8 está relacionada con los procesos de cicatrización y las metaloproteinasas dos y nueve (MMP-2 y MMP-9), también denominadas gelatinasas, presentan mayores concentraciones en la inflamación, por ejemplo, en las miopatías de tipo inflamatorio, como las polimiositis y dermatomiositis (Alameddine, 2012).

Sassoli et. al (2014), en cultivos de células mesenquimales estromales (MSC) evidenciaron mediante técnicas de inmunofluorescencia entre otras, el aumento en la expresión de MMP-2 y MMP-9, la regulación en la diferenciación miogénica de células indiferenciadas a células satélite, de células satélite a mioblastos y la diferenciación de fibroblastos esqueléticos que producen los elementos que constituyen la matriz y pueden generar o no fibrosis por exceso en la síntesis del componente fibrilar (Sassoli et al., 2014). De la misma manera, debe haber una interacción dinámica y coordinada entre células satélite y los fibroblastos presentes en el tejido conectivo durante la regeneración del tejido muscular estriado esquelético. Esta interacción consiste en la regulación entre sí, de la producción de factores de transcripción como Tcf4, el cual influye en la función tanto de los fibroblastos como en la diferenciación de las células satélite (Murphy, Lawson, Mathew, Hutcheson, & Kardon, 2011) .

La fibrosis es una consecuencia relacionada con la severidad de lesión; factores como el de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) y el interferón gamma (IFN- γ), mediadores de fibrosis, se encuentran elevados frente a isquemia de dos horas

con perfusión de ocho horas y sus niveles se reducen tres días después; por el contrario, en el caso de contusión asociada, en el que el grado de lesión tiende a ser mayor, las concentraciones de ambos factores son mayores en los siguientes tres días. En tinciones específicas para el tejido conectivo como Sirius red e inmunohistoquímica, realizadas 21 días después de la lesión, aumenta el depósito de colágeno tipo I, indicador de respuesta fibrótica, asociado a destrucción de las fibras musculares (Ghaly & Marsh, 2010); a mayor grado de lesión, los procesos de regeneración se ven afectados negativamente dado por el estrés oxidativo durante la inflamación. En el caso de músculos sometidos a periodos cortos de isquemia y perfusión, el proceso de regeneración puede no verse afectado si el grado de lesión es menor.

Corona & Rathbone (2014) evidenciaron que los músculos tibial anterior y extensor largo de los dedos sometidos a dos (2) horas de isquemia, perfusión de cero, uno, tres, siete, 14, 21 y 28 días e inyección intravenosa de células mesenquimales dos días después de la lesión, se presentan resultados positivos en cuanto a regeneración tisular y disminución en un 40% de miocitos con núcleos centrales a los 14 días. Al administrarse vía intravenosa células indiferenciadas derivadas de médula ósea, también se da un incremento en la vascularización a un nivel cercano a lo observado en los músculos control (Corona & Rathbone, 2014), al día 28 el patrón histológico es similar al normal. Los procesos de angiogénesis requieren de migración celular, la presencia de factores de transcripción como el de crecimiento vascular endotelial (VEFG), iones calcio, anclaje del endotelio a la matriz extracelular y síntesis de uniones laterales y basales así como, de una membrana basal que lo relacione con el tejido conectivo (Scianna, Bell, & Preziosi, 2013). Se ha descrito que durante la regeneración muscular tienden a aumentar los niveles de la cadena pesada de miosina en mayor proporción en las ratas jóvenes que en las mayores; en ambos grupos, los músculos pueden adaptarse frente a estímulos de carga o contracción frecuentes, para este caso, generando hipertrofia muscular (Cutlip, Baker, Hollander, & Ensey, 2009). Al comparar los cambios histológicos de músculos sometidos a dos horas de isquemia y siete (7) a 14 días de perfusión, en ratas jóvenes y mayores, se observa en ambos alteraciones en el patrón normal, con mejor capacidad de regeneración en los biomodelos jóvenes (Hammers et al., 2012). Por otra parte, en procedimientos en músculos de ratas sometidos a isquemia de una hora, inducida mediante oclusión arterial directa, con perfusión de 5 días, son evidentes los núcleos centrales en tinción de hematoxilina-eosina, los cuales disminuyen progresivamente hacia el día 14 donde ya no se observan (Itoh & Kudoh, 2011).

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar los cambios histoquímicos y morfométricos presentados en periodos cortos de isquemia y prolongados de reperfusión, en los músculos extensor radial largo del carpo y sóleo.

6.2 Objetivos específicos

1. Describir la distribución de las fibras musculares esqueléticas, la matriz extracelular intramuscular y los cambios de lesión en los músculos soleo y extensor radial largo del carpo que se presenta durante 1 y 3 horas de isquemia, seguido de 1 hora, 16 horas, 1, 2, 4, 8, 16, 24 y 32 días de reperfusión.
2. Establecer comparaciones en la distribución de las fibras musculares esqueléticas, la matriz extracelular intramuscular y los cambios de lesión en los músculos soleo y extensor radial largo del carpo que se presenta durante 1 y 3 horas de isquemia, seguido de 1 hora, 16 horas y 1, 2, 4, 8, 16, 24 y 32 días de reperfusión.

7. Planteamiento de hipótesis

- a. Las diferencias histoquímicas y morfométricas que se presentan en el tejido muscular estriado esquelético y el tejido conectivo intramuscular del extensor radial largo del carpo, sometido a una y tres horas de isquemia frente a los diferentes periodos de reperfusión, son significativas.
- b. Las diferencias histoquímicas y morfométricas que se presenta en el tejido muscular estriado esquelético y el tejido conectivo intramuscular del sóleo sometido a una y tres horas de isquemia frente a los diferentes periodos de reperfusión, son significativas.

8. Diseño metodológico

8.1. Tipo de estudio

Estudio experimental realizado mediante una situación simulada en la que se modificaron voluntariamente los tiempos de isquemia y reperfusión, para comprobar la manera en que estas variables influyen en los cambios histoquímicos y morfométricos que se observaron sistemáticamente.

8.2. Unidad de análisis

El presente trabajo de investigación se desarrolló con base en un modelo de experimentación con biomodelos. La rata Wistar corresponde a una variedad creada para estudios de laboratorio, similar al género *rattus novergicus*, cuya vida promedio se encuentra entre dos y tres años. Como característica relevante, no presentan vómito, regurgitación ni broncoaspiración, dada su constitución esofágica. Taxonómicamente se clasifica como (figura 6) :

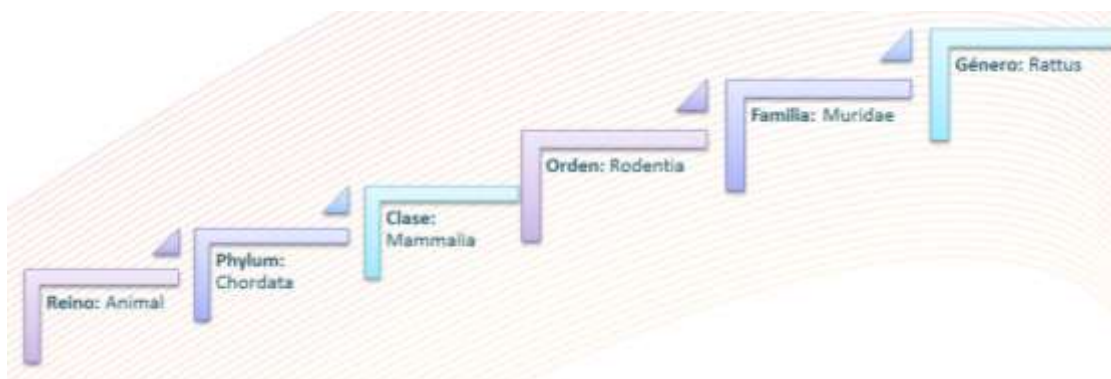


Figura 6. La especie Wistar fue creada por modificación genética a partir del género *rattus*, para investigación biomédica.

Estos fueron suministrados por el Bioterio de la Facultad de salud de la Universidad del Valle, el cual cumple con los requerimientos establecidos en las normas nacionales e internacionales recogidas en el manual del bioterio de la Facultad de Salud, Ley 84 de 1989, Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Institute of Laboratory Animal Research, Comisión on Life Sciences National Research Council y reglamento del Bioterio (Resolución No. 171 de Noviembre 10 de 2004 del Consejo de la Facultad de Salud).

Se emplearon 42 ratas Wistar adultas machos cepa albina, con pesos entre 299 y 555 gramos, las cuales se mantuvieron en grupos de una a tres ratas en cada jaula plástica, cuyas dimensiones para la grande son de 47 cm de largo x 26 cm de ancho x 20 cm de alto. La jaula individual presenta 26 cm de largo x 23 cm de ancho x 21 cm de alto. Los biomodelos permanecieron en el bioterio, con las condiciones de humedad y temperatura que allí se manejan:

Temperatura: 20°C - 23°C

Humedad: 38%-66%

8.3. Criterios de inclusión

- ✓ Especímenes adultos, sanos, machos, con peso mayor a 250 gramos
- ✓ Sin criterios de exclusión.

8.4. Consideraciones éticas

El presente trabajo contó con el aval del Comité de Ética Animal de la Universidad del Valle según Acta nº 001 del 23 de junio de 2011. En diciembre de 2013 fue aprobado el cambio del título por el actual (anexo 13.5)

Todos los biomodelos fueron manejados de acuerdo a las normas éticas Nacionales e Internacionales reunidas en el manual del bioterio de la Facultad de Salud.

Los procedimientos que se emplearon durante el presente estudio en principio no causaron sufrimiento a los animales de experimentación, ya que durante las etapas experimentales estuvieron en plano anestésico profundo. Durante la permanencia en el bioterio, el bienestar de los biomodelos fué continuamente supervisado por el grupo de trabajo con la ayuda del veterinario asignado y todos los procedimientos fueron llevados a cabo teniendo presentes las normas de bioseguridad.

8.5. Diseño experimental

El desarrollo experimental iniciado en el mes de enero de 2012 se realizó en el Laboratorio de Histología y en el bioterio de la Universidad del Valle.

El protocolo experimental se llevó a cabo en tres fases. En la fase 1 o quirúrgica, se clasificó aleatoriamente cada grupo, se colocó y liberó el torniquete en los

tiempos establecidos y finalizó con la eutanasia del biomodelo. Para ello se tuvo en cuenta las normas de asepsia que aplican en el área clínica.

En la fase 2 o de procesamiento histoquímico, los músculos fueron disecados y procesados para estudio histológico.

En la fase 3 o de análisis de imágenes se realizó morfometría de los cambios observados en las muestras procesadas.

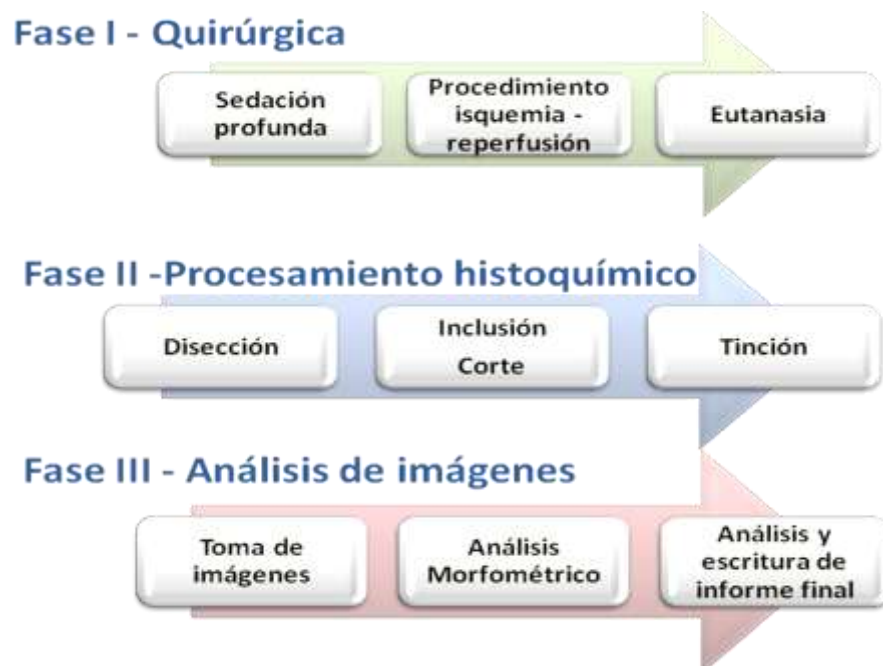


Figura 7. El diseño experimental para este estudio fue de tres fases y nueve subfases. Fueron de realización inmediata el final de la fase uno, con el inicio de la fase dos.

Se analizaron los efectos de dos variables independientes en relación con las variables dependientes establecidas; la selección y asignación de los biomodelos se dio de manera aleatoria y se controlaron las condiciones para la inducir isquemia y permitir cada periodo de reperusión (Mendoza, 2002).

8.5.1. Fase I – Quirúrgica

8.5.1.1. Distribución de los grupos

Se tuvo un (1) grupo control y 20 grupos experimentales de isquemia e isquemia-reperfusión, cada uno con dos biomodelos (n= 2), distribuidos así:

Cuadro 2. Grupo control

Biomodelos control		Numero
1 hora	1	C1
3 horas	1	C3
Total	2	

Cuadro 3. Grupos experimentales de isquemia

Grupo experimental isquemia		Número
1 hora	2	E1 – E2
3 horas	2	E3 – E4
Total	4	

Cuadro 4. Grupos experimentales de isquemia-reperfusión

Isquemia	Reperfusión	nº biomodelos	Número
1 hora	1 hora	2	E5-E6
	16 horas	2	E7- E8
	1 día (24 horas)	2	E9 – E10
	2 días (48 horas)	2	E11 – E12
	4 días (96 horas)	2	E13 – E14
	8 días (192 horas)	2	E15 – E16
	16 días (384 horas)	2	E17 – E18
	24 días (576 horas)	2	E19 – E20
	32 días (768 horas)	2	E21 – E22
3 horas	1 hora	2	E23 – E24
	16 horas	2	E25 – E26
	1 día (24 horas)	2	E27 – E28
	2 días (48 horas)	2	E29 – E30
	4 días (96 horas)	2	E31 – E32
	8 días (192 horas)	2	E33 – E34
	16 días (384 horas)	2	E35 – E36
	24 días (576 horas)	2	E37 – E38
	32 días (768 horas)	2	E39 – E40
Total		36	

8.5.1.2. Preparación del espacio físico

El espacio en el Bioterio estuvo acondicionado con balanza, termohigrómetro digital, mesa quirúrgica y torniquetes manuales de isquemia con brazaletes de tamaño adecuado para los biomodelos (figuras 8 y 9). Este sitio no requiere contar con sistema de presión positiva ni filtros de partículas de aire de alta eficiencia (HEPA), por cuanto no se requiere invadir el biomodelo para llevar a cabo el modelo de isquemia.



Figura 8. Sección del cubículo asignado para desarrollar los procedimientos. En la imagen se muestran los equipos utilizados para la preparación preoperatoria del modelo. Mediante cámara de vidrio se administró la anestesia inhalatoria.



Figura 9. Equipos y medicamentos utilizados para llevar a cabo el modelo de isquemia y reperfusión. La lámpara se colocó cerca a la mesa quirúrgica (flecha), la cual permite proveer termorregulación en el biomodelo.

Posterior a la verificación del correcto funcionamiento de todos los elementos, se continuó con la toma de las medidas zoométricas al biomodelo, las cuales se registraron en el formato diseñado para tal fin (anexo 13.2):

- Peso
- Longitud cráneo-cola,
- Longitud cráneo-extremidad inferior,
- Diámetro de cada extremidad (anterior derecha y posterior izquierda).

8.5.1.3. Sedación profunda, mantenimiento anestésico y analgesia postquirúrgica

Todos los procedimientos de isquemia y reperfusión se manejaron con el carácter de quirúrgicos, es decir, en cada biomodelo se dieron las fases preoperatoria, intraoperatoria y postoperatoria; cada una importante en la supervivencia de los machos Wistar. Las cirugías se clasificaron como menores no invasivas, que en el área clínica son de tipo ambulatorio.

En el preoperatorio, los biomodelos fueron inmovilizados, pesados y luego llevados a sedación profunda. La inmovilización se realizó con la administración de anestesia inhalatoria con Isoflurano al 100% (ISOFLUORANO USP® - Baxter) frasco 100 ml, mediante cámara de vidrio a concentración de 0.5 ml durante tres (3) a cinco (5) minutos (figura 10); posteriormente se obtuvo mediciones y se administró la dosis de inducción de pentobarbital a 4-5 mg/100 gramos (cuadro 6).

Cuadro 5. Administración anestésica

Premedicación (Si-No)	Inducción	Mantenimiento	Recuperación
No	Inhalatoria		
	Intraperitoneal	Intraperitoneal	Sin medicación

La sedación profunda se indujo mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Penthal® - INVET 64.8 mg/1ml), frasco por 20 ml, dosis 4-5 mg/100gramos de peso corporal y se mantuvo con el mismo medicamento a dosis de 2 mg/100gramos cada 35 minutos. Para los biomodelos sometidos a isquemia hasta tres horas, se administraron dosis de 1mg/100gramos a partir de la segunda dosis de mantenimiento y hasta finalizar el procedimiento.

El pentobarbital sódico es un barbitúrico con efecto sedante e hipnótico utilizado en Medicina Veterinaria como agente inductor de anestesia general y es el medicamento de preferencia en procedimientos prolongados, puesto que permite continuidad al estado de inconsciencia; según el tiempo durante el cual fue administrado, la recuperación anestésica también puede ser prolongada.

Cuadro 6. Inducción anestésica

Vía de administración	Inhalatoria	Intraperitoneal
Medicamento	Isoflurano frasco 100 ml	Pentobarbital sódico frasco 20 ml
Dosis	0,5 ml en cámara de vidrio	4 mg/100 gr
Duración	2 a 5 minutos	Una vez

Cuadro 7. Esquema de mantenimiento anestésico

Medicamento	Pentobarbital sódico frasco 20 ml
Dosis	2 mg / 100 gr
Intervalo	35 minutos después de la dosis de inducción
Isquemia de 1 hora	una a dos dosis
Dosis de continuidad	1 mg /100 gr
Intervalo	cada 35 minutos a partir de la segunda dosis de mantenimiento
Isquemia de 3 horas	tres a cuatro dosis

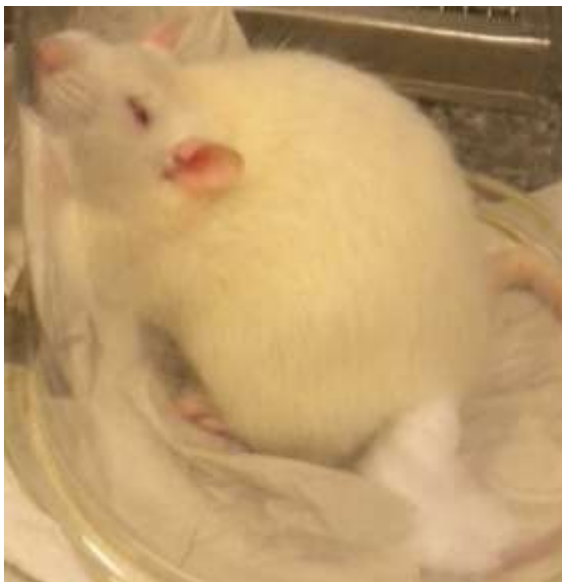


Figura 10. Administración de isoflurano vía inhalatoria en cámara de vidrio. El tiempo promedio para lograr pérdida de la consciencia oscila entre dos (2) a cinco (5) minutos.

Los biomodelos correspondientes a los periodos prolongados de reperusión recibieron analgesia postquirúrgica con Tramadol gotas 100mg/ml frasco por 10 ml, a una dosis de 2mg/100 gr vía oral cada 12 horas durante las primeras 48 horas de postoperatorio. Por recomendación del veterinario se administraron dos gotas de Tramadol sublingual antes de la colocación del pentobarbital como profilaxis analgésica. Así mismo, se dejó en el frasco de agua con 250 ml, cinco (5) a seis (6) gotas del medicamento.

8.5.1.4. Procedimiento de isquemia y reperusión

El inicio del tiempo de isquemia se dio con la insuflación del torniquete neumático. Este elemento está indicado para aquellos estudios en los que es necesario conocer y controlar la cantidad de presión requerida para interrumpir el flujo sanguíneo a nivel de capilares arteriales. El brazalete debe tener una superficie lisa, en forma de arco, diseñado con el tamaño apropiado para la extremidad y estar integrado a un sistema de inflación (Estebe, Davies, & Richebe, 2011). El torniquete de isquemia utilizado consta de un brazalete de 14 centímetros de largo por cuatro (4) centímetros de ancho, fabricado en cubierta de tela kodra con centro de caucho sintético, similar al material con que se fabrican las llantas de bicicleta. Se complementó con una correa hecha en tela adhesiva para fijar el dispositivo a la extremidad del biomodelo. Presenta dos mangueras adaptadas al centro con aproximadamente nueve (9) centímetros de largo; una de ellas corresponde a la conexión al manómetro convencional de 300 mm Hg, nuevo y graduado en cero, para la medición de la presión de isquemia; la otra, se encuentra adaptada a una bomba de insuflación manual que puede colocarse y retirarse una vez se logra la presión deseada. Entre la manguera de insuflación y la bomba, se colocó a su vez una extensión adaptada a una válvula de retención del aire, con el fin de mantener la presión de isquemia constante por encima de 250 mm Hg; se dieron pérdidas ocasionales de aire, con lo que se debía permanecer atento a la disminución de la presión para insuflar nuevamente. Se hacía una o dos veces en cada procedimiento (figura 11). Es de aclarar que este equipo no es patentable, por cuanto ya han sido diseñados dispositivos relacionados en el pasado, que cumplen una función similar. El registro de este equipo se realizó mediante trámite notarial y en la página web de la Dirección nacional de derecho de autor (DNDA).



Figura 11. Dispositivo para inducción de isquemia. 1: Brazalete con cubierta en tela kodra y centro de caucho sintético. 2: mangueras de conexión al manómetro y a la bomba de insuflación manual. 3: Manómetro. 4: Bomba de insuflación. 5: Extensión de adaptación para la bomba. 6: Válvula de retención de aire.

Al colocar ambos torniquetes se tuvo en cuenta evitar la descompensación por presión y la carga hemodinámica a la cual tal procedimiento conllevaba; por estas razones, los dos torniquetes fueron colocados del lado contrario, es decir, en la extremidad anterior en el lado derecho y en la extremidad posterior en el lado izquierdo (figura 12).

La evidencia ha mostrado que las ratas manejan un promedio de presión arterial sistólica de 113 ± 13.7 y diastólica de 91 ± 13.6 (Flores, Infante-Vasquez, G., & al., 2002). La presión de isquemia que se utiliza en el área clínica corresponde a 70 – 100 mmHg por encima de la presión sistólica (Estebe et al., 2011).

Inicialmente en los primeros diez biomodelos se rasuraron las extremidades antes de colocar el torniquete, posteriormente, se decidió rasurar el día de la eutanasia, antes de administrar la dosis letal. Esto evitaba que el biomodelo se encontrara bajo efectos de inducción anestésica por tiempos prolongados que lo colocaban en riesgo anestésico alto. En ninguno de los grupos fueron desinsertados los músculos durante la inducción de isquemia o reperusión, razón por la cual no fue necesario aplicar yodopovidona como medida de antisepsia, ni realizar vendajes en las extremidades antes de la colocación del torniquete.



Figura 12. Procedimiento de isquemia. El procedimiento de isquemia (A) se produjo mediante torniquete neumático colocado en la extremidad anterior derecha (B) con presión superior a 250mmHg (C) durante una y tres horas. Así mismo, en la extremidad posterior izquierda (D). Las reperfusiones fueron de una hora, 16 horas y 24 horas, dos, cuatro, ocho, 16, 24 y 32 días.

8.5.1.5. Eutanasia

La eutanasia se realizó mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Penthal® - INVET) de 20 mg/100 gramos de peso corporal, que corresponde aproximadamente a uno a dos mililitros del medicamento (1-2 ml).

Luego de aplicar esta dosis letal, el animal permaneció bajo observación entre cinco a quince minutos, tiempo durante el cual se verificó el cese de la respiración, la ausencia de latidos cardiacos, la presentación de córnea opaca y relajación de esfínteres. En presencia de estos signos de muerte, se procedió con la disección de los cuatro músculos (anexo 13.3.1).

8.5.2. Fase II

Esta fase contempla dos etapas: disección de los músculos y el procesamiento histoquímico de las muestras.

8.5.2.1. Disección de los músculos, inclusión y fijación por congelación

La disección de los músculos a los cuales se les aplicó la presión de isquemia, se realizó por planos y en su mayoría, en tiempos inferiores a 15 minutos (figura 13). Luego se procedió con la toma de medidas mediante herramienta pie de rey y balanza electrónica para obtener el peso de las muestras musculares). La medición de la longitud del componente muscular se realizó sin tener en cuenta los tendones de origen e inserción. La medición del diámetro se realizó en el punto medio de la longitud medida, es decir, en la porción más ancha del músculo. Los datos se registraron en el formato correspondiente (anexo 13.3.1).

Tanto para la primera como para la segunda fase, se contó con la disposición de un monitor de investigación, estudiante de medicina de sexto semestre, quien adquirió habilidades de disección previamente en su curso de anatomía macroscópica. Esto hizo posible reducir los tiempos de disección y congelación de las muestras.

Las piezas del instrumental seleccionado para llevar a cabo las disecciones tuvieron mantenimiento previo que consistió básicamente en afilado, limpieza y evaluación del funcionamiento de cada una. La técnica de disección se describe en el Procedimiento Operacional Estándar correspondiente (anexo 13.3.1).

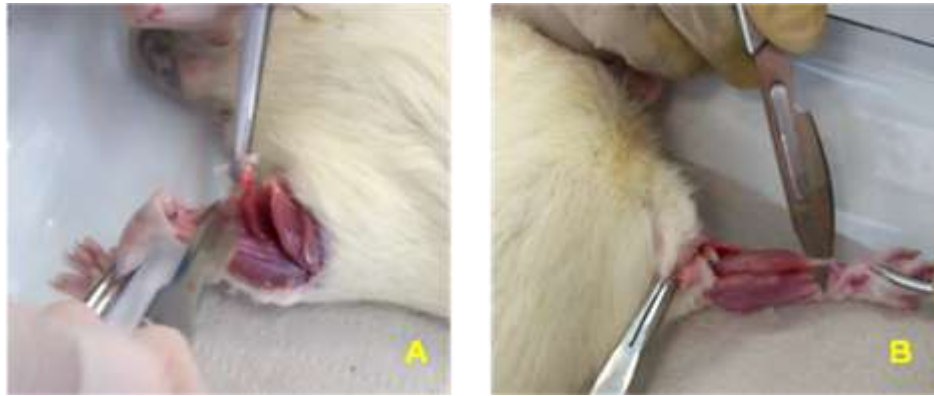


Figura 13. Disección de los músculos esqueléticos sóleo (A) y extensor radial largo del carpo (B); en ambos casos desde la inserción distal hacia la inserción proximal.

Finalizado el procedimiento de disección de las muestras musculares, el animal se dispuso en una bolsa plástica y se llevó al congelador, para luego ser entregado a la ruta hospitalaria de acuerdo con el protocolo de manejo de residuos anatomopatológicos del Departamento de Morfología (Salud & ambiente, 2004). De la misma manera, el instrumental y los demás elementos utilizados fueron llevados a desinfección. El paso inicial fue lavado y fricción mecánica con detergente, para evitar que material orgánico permanezca en las ranuras de los instrumentos. Posteriormente, la desinfección de nivel medio se llevó a cabo con hipoclorito de sodio a concentración de cinco (5) gramos del compuesto clorado por cada litro de agua (Vignoli, 2006). Se dejó durante aproximadamente diez minutos y se finalizó con el enjuague. No se realizó esterilización ya que no fue necesario invadir el biomodelo durante la isquemia.

La desinfección de nivel medio también se aplicó a la mesa de disección, bandejas y demás elementos utilizados durante este procedimiento.

8.5.2.2. Inclusión y corte

Para garantizar resultados adecuados, se tuvo en cuenta en la realización de las técnicas enzimáticas, las precauciones en el manejo de la muestra una vez es obtenida (Dubowitz, Brooke, & Neville, 1973). Teniendo las muestras en nevera portátil, se transportaron al área de criotomía del Laboratorio de Histología de la Universidad del Valle, en donde se seccionaron transversalmente en tres partes iguales. Cada sección se colocó perpendicular al cassette de inclusión, se agregó Tissue Tek (O.C.T.) y se congelaron en isopentano (2-metylbutano 99.5%) a -70°C enfriado en nitrógeno líquido a -160°C durante 2 minutos aproximadamente.

Estas se almacenaron en bolsas de aluminio marcadas con el número del biomodelo, el músculo y la sección a la que correspondían.

Las muestras incluidas fueron cortadas en criostato marca Leica modelo Jung Frigocut 2800 N a -20°C, a un grosor de 16 μ m (Kalmar, Blanco, & Greensmith). Cada corte se colocó en placas ionizadas marca SUPERFROST PLUS®, las cuales mejoran la adherencia del tejido al vidrio y evita su desprendimiento durante los procedimientos. La calidad y orientación del corte obtenido se comprobó mediante tinción rápida con hematoxilina-eosina.

Para el procesamiento se seleccionaron por muestreo aleatorio sistemático, los bloques de las inserciones distales de los biomodelos con número impar. Esto con el fin de asegurar que fuera elegido un bloque de cada grupo.

En total se cortaron 42 bloques de los cuales se obtuvo ocho placas que fueron distribuidas para cada tipo de tinción. Estas fueron marcadas con el código correspondiente al biomodelo, seguida del tipo de músculo y la sección a la que pertenecía, por ejemplo, SI (sóleo izquierdo) o ED (extensor derecho), respectivamente.

Tanto el sóleo como el extensor radial largo del carpo se sometieron a las siguientes tinciones histoquímicas:

- Convencional: Hematoxilina-eosina
- Convencional: Tricrómica de Gomori modificada
- Enzimática: NADH-TR (Nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolium reductasa)
- Enzimática: m ATPasa 4.6 (miosina adenosin trifosfatasa pH 4.6)

8.5.2.3. Procedimiento histoquímico (tinción)

La utilidad de las técnicas de histoquímica aplicadas en el tejido muscular estriado esquelético está relacionada con la determinación de fibras musculares funcionalmente distintas, como en el caso de las tinciones enzimáticas. Enzimas oxido-reductasas como NADH y fosforilasas reaccionan a los compuestos de tinción, lo que permite visualizar las fibras con mayor contenido de las mismas, para NADH, fibras oxidativas.

Durante los períodos prolongados de reperfusión, los mecanismos de regeneración tanto en músculos con predominancia glucolítica como oxidativa,

están representados por aspectos como el aumento en la celularidad, la asociación con el tejido conectivo y la vascularización, entre otros.

Los protocolos que se utilizaron para llevar a cabo estas técnicas, se estandarizaron con base en trabajos similares en caracterización de músculos esqueléticos obtenidos de animales pequeños (Sanchez-Collado, 2009) y su aplicación funciona en tejido animal y no humano (anexos 13.3.2., 13.3.3., 13.3.4. y 13.3.5).

8.5.3. Fase III

Esta fase contempló tres etapas: toma de imágenes, análisis morfométrico y análisis estadístico.

8.5.3.1. Toma y almacenamiento de imágenes

Las placas obtenidas de las respectivas tinciones, fueron observadas en el microscopio de luz en los aumentos de 4x, 10x, 40x. El equipo utilizado fue un microscopio marca Leica DM750 con cámara digital DFC295 referencia CH 9435, ambos adaptados a un computador DELL. Este equipo se encuentra en el salón de microscopía del Departamento de Morfología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Se utilizó el software LASV3.8 para toma de imágenes e Image Pro Plus versión 7.0 Marca Media Cybernetics para el análisis de imágenes. El código de la placa, una vez puesta sobre la platina, siempre estuvo a la izquierda.

Se estandarizaron los parámetros de uso de objetivos, exposición y distancia; para ello fue importante tener en cuenta apertura del diafragma del objetivo en relación a la exposición de la muestra a la luz (Alfaro, Rocca, & Poblet, 2003). El software de toma de imágenes cuenta con parámetros de ajuste de contraste, intensidad de luz y exposición a la luz de forma manual o automática. Los valores correspondientes de estandarización fueron (cuadro 8):

Cuadro 8. Parámetros de toma de imágenes

Parámetro	4x	10x	40x
<i>Exposición</i>	Automática	Automática	Automática
<i>Intensidad de luz manual</i>	Baja	Baja	Media
<i>Ajuste de brillo</i>	75%	50%	100%
<i>Saturación</i>	1,1	1,1	1,1
<i>Gamma</i>	0,6	0,7	0,5

Las imágenes se nombraron con el número del biomodelo, el músculo al que pertenece la placa, el tipo de tinción y el aumento en el que fue adquirida cada imagen. Se almacenaron en una carpeta general denominada Fase 3. En su interior, esta contiene carpetas nombradas con la numeración correspondiente de cada biomodelo procesado, desde C1 hasta E39. A su vez, cada una cuenta con dos carpetas una para el sóleo y otra para el extensor radial largo del carpo. Dentro de la carpeta del músculo, hay tres más que corresponden a los aumentos en los que fueron tomadas las imágenes; cada aumento tiene las carpetas de cada tinción en las que se encuentran las respectivas microfotografías (figura 14).

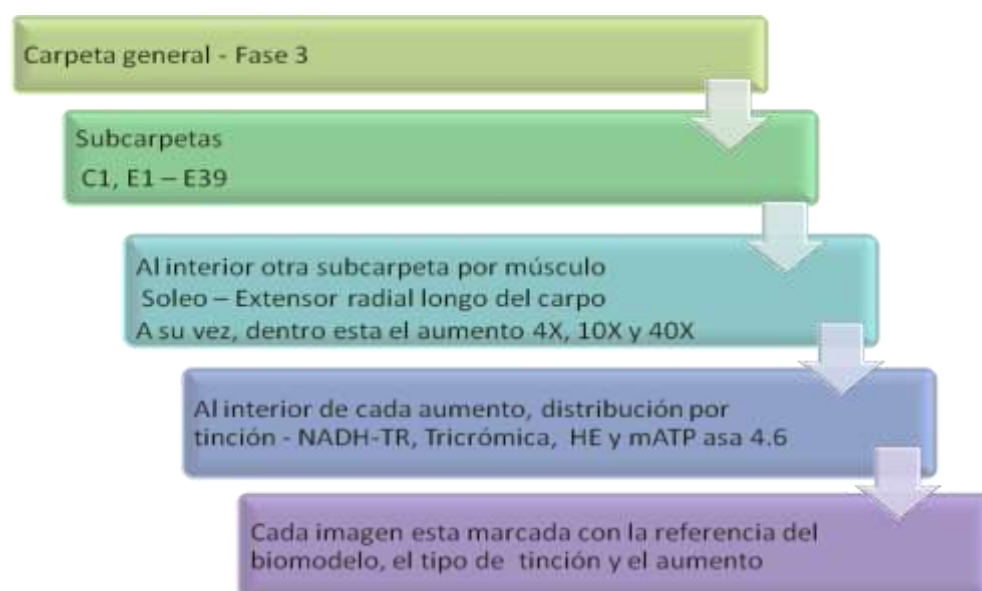


Figura 14. Secuencia de almacenamiento de las imágenes adquiridas.

En total se obtuvo 3880 imágenes, 1945 para el sóleo y 1935 para el extensor radial largo del carpo. Se seleccionaron las imágenes de 10X y 40X en general y entre estas se descartaron aquellas con defectos de preparación que pudiesen

generar sesgos en la morfometría, para un consolidado de 1497, de las cuales se seleccionó aleatoriamente 483, teniendo en cuenta el tamaño muestral previamente calculado (figura 15):

Tamaño muestral n, por muestreo aleatorio simple para proporciones

$$n = \frac{NZ^2pq}{d^2(N-1) + Z^2pq}$$

Z=1.96 p=0.5 q=0.5 d=5% nivel de confianza= 95%

n = 423

Mas el 10% por pérdida n= 470

Figura 15. Calculo del tamaño muestral de las imágenes para análisis morfométrico.

A estas imágenes se les cambió la marcación que ya tenían y se les enumeró con un consecutivo desde el uno (1) hasta el 483, de este modo, al realizar la morfometría, se evita orientar la medición de acuerdo con el periodo de isquemia o reperfusión correspondiente.

8.5.3.2. Morfometría

8.5.3.2.1. Procesamiento y análisis morfométrico

El análisis de una imagen digital bidimensional permite establecer características, por ejemplo, de normalidad y anormalidad tanto en las fibras musculares esqueléticas como en la matriz extracelular intramuscular, durante los diferentes períodos de reperfusión. Para obtener la información necesaria, cada imagen debe ser procesada, para luego ser medida e interpretada. El procesamiento digital incluye dos aspectos a considerar; el primero es el mejoramiento en la calidad de la imagen, de modo que sea posible una interpretación visual sin morfometría; el segundo, implica determinar las regiones de interés a medir, de modo que a partir de una imagen A, a la cual se agregó énfasis en las áreas para la aplicación de los parámetros morfométricos previamente definidos en el estudio, se obtiene una imagen B (figura 16) para análisis de imágenes; el énfasis de las regiones de interés se realiza mediante la aplicación automática o semiautomática de máscaras de color en el área seleccionada, las cuales deben ser específicas para cada región (Young, Gerbrands, & van Vliet, 1998) (Maldjian, Laurienti, Kraft, & Burdette, 2003). Las tinciones histoquímicas enzimáticas y convencionales, inicialmente hacen evidente la identificación de estas regiones, así como morfología celular, distribución, clasificación y relación con el tejido conectivo, por lo que el software que se emplea para el análisis de imágenes, para este caso, Image Pro Plus versión 7.0, reconoce total o parcialmente el parámetro

a medir. La identificación de la extensión de las áreas que el programa realiza, se da mediante los colores básicos azul, rojo y verde (canales RGB), conceptos que aplican para las imágenes en color y en escalas de grises. Diferentes intensidades o variaciones de color pueden encontrarse en un pixel, desde 256 para las imágenes en gris o monocromáticas, hasta 16.777.216 variaciones para las imágenes en color.

El procesamiento inicial que tuvieron las imágenes seleccionadas, corresponde a la conversión a escala de grises, el canal utilizado fue el verde, dado que provee la mejor nitidez al aplicar los parámetros de medición (figura 17). La escala de intensidades en imágenes monocromáticas que reconocen los programas de análisis de imágenes, se encuentran entre cero (0) para las tonalidades blancas a 255 para el negro.

Una vez todas las imágenes fueron convertidas, se procedió con la calibración en micras para las mediciones en los aumentos 10X y 40X, mediante la placa de calibración para microscopios, la cual cuenta con un milímetro de longitud en 100 divisiones y cada una de ellas corresponde a 0.01 mm (anexo 13.3.6).

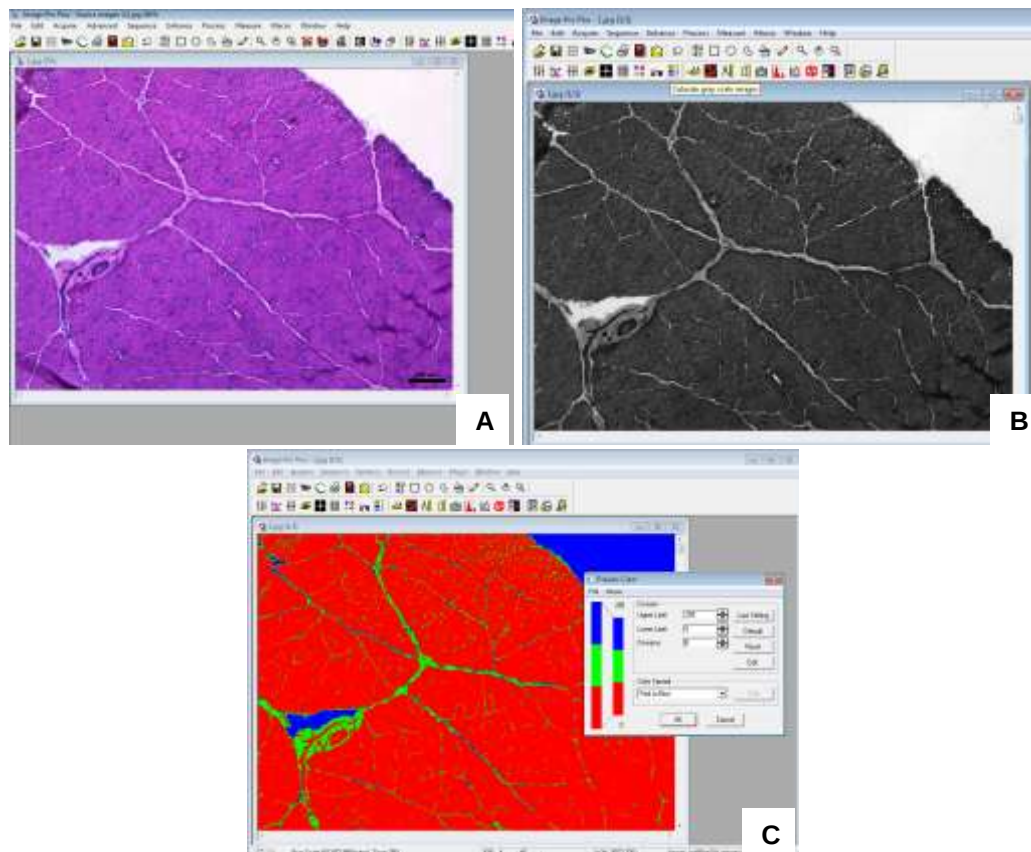


Figura 16. Procesamiento digital de una imagen, A. Músculo extensor radial largo del

carpo 10X en tinción hematoxilina-eosina. B. Imagen en escala de grises en el canal verde (Green). C. Regiones de interés correspondiente a fibras musculares en rojo y matriz extracelular en verde. La región de no interés se encuentra en color azul.

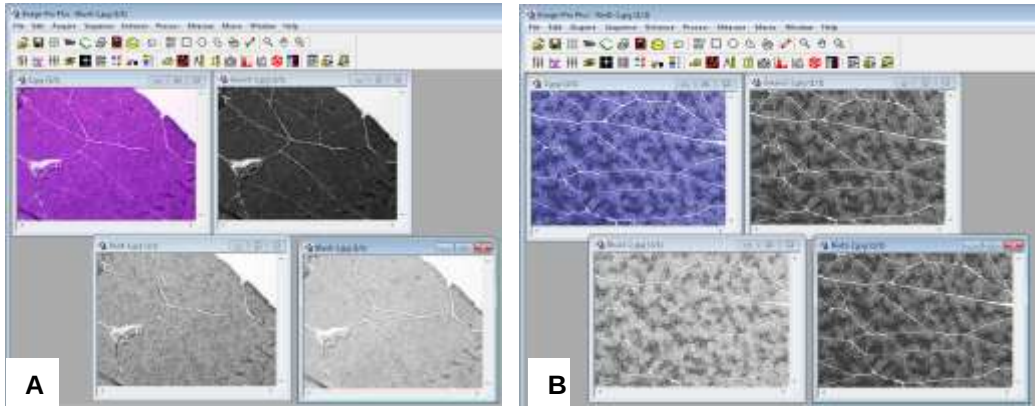


Figura 17. Conversión de imágenes en color a escala de grises en los canales RGB (red-green-blue). **A.** Extensor radial largo del carpo en tinción hematoxilina-eosina, el canal verde presenta mejor definición tanto en las fibras musculares como de la matriz extracelular intramuscular. **B.** Extensor radial largo del carpo en tinción NADH-TR, el canal verde permite identificar con mayor detalle las fibras oxidativas, glucolíticas e intermedias.

Se utilizó dos herramientas para la morfometría, conteos semiautomáticos y énfasis de las regiones de interés mediante color (cuadro 9). Para cada variable se realizaron dos mediciones.

Cuadro 9. Morfometría en imágenes de tejido muscular estriado esquelético sometido a lesión por isquemia y reperusión. HE: hematoxilina-eosina; TGM: Tricrómica de Gomori modificada.

Tinción	Parámetro de medición	Herramienta
HE y TGM	Área que ocupan las fibras musculares	Color de imagen en escala de grises
	Área que ocupa la matriz extracelular intramuscular	Color de imagen en escala de grises
HE	Infiltración en el conectivo (presente/ausente)	
	Infiltración en los miocitos (parcial o completa)	

	Forma de las células (hexagonales y circulares)	Mediciones manuales (conteo semiautomático)
	Localización de los núcleos (ausentes, periféricos y centrales)	Mediciones manuales (conteo semiautomático)
	Miotubos / mioblastos	Mediciones manuales (conteo semiautomático)
	Hipertrofia / Atrofia	
	Vacuolas / Desorganización del citoplasma/ Fractura por congelación	Mediciones manuales (conteo semiautomático)
NADH	Predominancia de fibras oxidativas, intermedias y glucolíticas	Color de imagen en escala de grises
ATP asa	Predominancia de fibras oxidativas, intermedias y glucolíticas	Color de imagen en escala de grises

8.5.3.3. Clasificación de las variables de estudio

Las variables se categorizaron de la siguiente manera (cuadro 10):

Cuadro 10. Clasificación de las variables establecidas en el estudio

Variable	Categoría	Unidad de medida	Escala
Isquemia de una hora y reperusión de una hora, dos horas, cuatro horas, 16 horas, 24 horas, 2 días, 8 días, 16 días, 24 días y 32 días	Independiente	Horas	Razón
Isquemia de tres horas y reperusión de una hora, dos horas, cuatro horas, 16 horas, 24 horas, 2 días, 8 días, 16 días, 24 días y 32 días	Independiente	Horas	Razón
Tipo de músculo	Independiente		
Objetivo / aumento del campo microscópico	Independiente	10x y 40x	Intervalo
Tipo de tinción	Independiente		

• Área que ocupan las fibras musculares	Dependiente	Micras	Razón
• Área que ocupa la matriz extracelular intramuscular	Dependiente	Micras	Razón
• Predominancia de las fibras oxidativa, intermedia y glucolítica	Dependiente	Micras	Razón
• Infiltración celular en el conectivo	Dependiente	Ausente/ Escaso/ Moderado/Abundante	Ordinal
• Fibras con forma hexagonal	Dependiente	Número	Intervalo
• Fibras con forma circular	Dependiente	Número	Intervalo
• Fibras con núcleos periféricos	Dependiente	Número	Intervalo
• Fibras con núcleos centrales	Dependiente	Número	Intervalo
• Fibras sin evidencia de núcleos	Dependiente	Número	Intervalo
• Fibras con infiltración focal parcial	Dependiente	Número	Intervalo
• Fibras con infiltración focal completa	Dependiente	Número	Intervalo
• Fibras con evidencia de necrosis	Dependiente	Número	Intervalo
• Presencia de miotubos / mioblastos	Dependiente	Número	Intervalo
• Presencia de edema	Dependiente	Número	Intervalo
• Presencia de atrofia	Dependiente	Número	Intervalo
• Desorganización de citoplasma/Tinción no homogénea/Fragmentación sin necrosis	Dependiente	Número	Intervalo
• Presencia de vacuolas	Dependiente	Número	Intervalo
• Fractura por congelación	Dependiente	Número	Intervalo

8.5.3.4. Análisis estadístico

Inicialmente se realizó el análisis exploratorio de datos, que consiste en la obtención de medidas de resumen, tendencia central, dispersión y gráficos tanto para las variables cuantitativas como cualitativas, con el fin de llevar a cabo de manera general, la identificación de los datos atípicos, perdidos, verificar supuestos para análisis posteriores y establecer diferencias entre sub-grupos. Se aplicaron las pruebas correspondientes para determinar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas:

1. Distribución normal: Kolmogorov – Smirnov
2. Homocedasticidad o igualdad de varianzas: Levene

Para este estudio, los datos no presentaron una distribución normal, de modo que es adecuado utilizar pruebas de estadística no paramétrica.

Con el fin de comparar las diferencias entre los periodos de isquemia de una y tres horas durante los diferentes periodos de tiempo de reperfusión y determinar su significancia, se utilizó la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney. Los contrastes a posteriori entre los pares de los períodos que presentaron diferencias significativas, se analizaron mediante la prueba de múltiples comparaciones de Bonferroni como post-anova no paramétrica.

En el caso de la variable reperfusión, en la que se tienen más de dos periodos de tiempo, se utilizó la prueba apropiada para la comparación intergrupos denominada Kruskal – Wallis, que corresponde al equivalente no paramétrico del análisis de varianza de una vía. Los supuestos que se cumplen para la aplicación de la prueba son (Gómez-Gómez, Danglot-Banck, & Vega-Franco, 2003):

1. Los datos provienen de un grupo aleatorio de observaciones
2. Las observaciones son independientes dentro de cada grupo y entre los grupos.
3. La variable independiente tiene dos grupos y las dependientes en su mayoría son cuantitativas de tipo continuo.

El programa estadístico utilizado fue SPSS versión 22. La información bibliográfica en este trabajo se organizó mediante el uso del software EndNote web versión X6, que también facilitó la citación de las referencias bibliográficas.

8.5.3.5. Impacto Ambiental

La obtención de la muestra no generó ningún riesgo ya que se llevó a cabo en un sitio adecuado, con la dotación indicada y preservando protocolos de bioseguridad de acuerdo a la ley vigente y Normativas internacionales. Para la conservación de los especímenes y su procesamiento, se contó, primero, con toda la experiencia del Grupo de Investigación Tejidos Blandos y Mineralizados y el laboratorio de Histología. Durante todos los procesos, los investigadores utilizaron bata, gafas, gorro y tapa-bocas de acuerdo con las normas de bioseguridad. Los desechos anatomopatológicos fueron depositados en los contenedores designados para ello según la normatividad de la Organización Mundial de la Salud y al Programa de Salud ocupacional de la Universidad del Valle, en lo referente al manejo de desechos biológicos y recolección de desechos por la ruta hospitalaria. Todas estas medidas fueron tomadas en cuenta para propender por el desarrollo de una investigación científica con un impacto ambiental favorable y de gran importancia en la salud humana. Los procedimientos de laboratorio y los resultados que obtenidos cuentan con una favorable relación costo-beneficio, en donde los beneficios dentro de las ciencias básicas con aplicación futura en la clínica son positivos y de importante trascendencia respecto al impacto ambiental. Al seguir los protocolos de bioseguridad descritos, este estudio no generó efectos en detrimento del medio ambiente y la salud humana.

9. Resultados

9.1. Condiciones del espacio y procedimientos

En relación con las condiciones en las que se desarrolló el diseño experimental, se tuvieron niveles de temperatura aproximados al ambiente de un quirófano, es decir, entre 20°C y 23°C, mientras que la humedad osciló entre 38%-66%, aspecto inherente a las condiciones locativas del bioterio (figura 18).

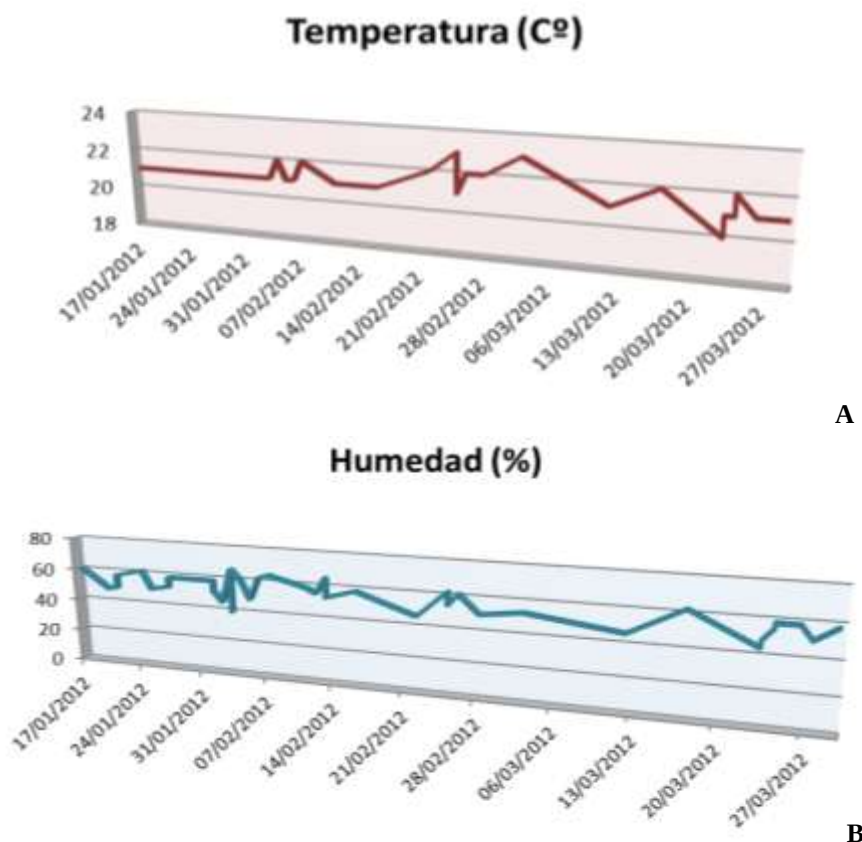


Figura 18. Seguimiento a las condiciones ambientales en el bioterio de la Universidad durante enero a marzo de 2012. A. La temperatura máxima fue 23°C, cercano a los valores aplicados en áreas clínicas y quirúrgicas. B. La humedad estuvo por encima del 55% en la mayoría de las ocasiones, lo cual se debió a las características locativas con las que contaba el espacio en su momento.

Durante la fase uno, la aplicación de las presiones de isquemia se mantuvo en el rango de 260 mmHg – 290 mmHg (figura 19). En la fase dos, la duración del tiempo de disección estuvo entre cuatro minutos a 20 minutos (figura 20), aspecto

Presiones de isquemia

•

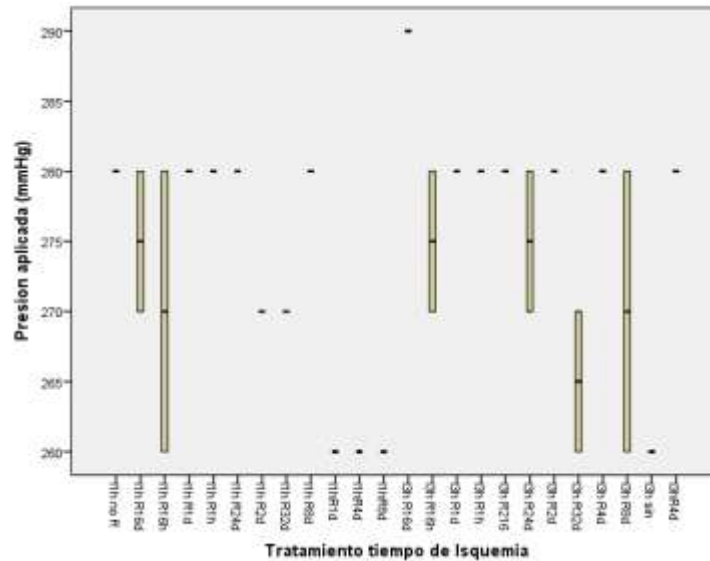


Figura 19. Presiones de isquemia aplicadas a los biomodelos según el grupo experimental, a los que aleatoriamente fueron asignados. Mínimo 260 mmHg y máximo 290 mmHg. Software de análisis estadístico SPSS versión 22.

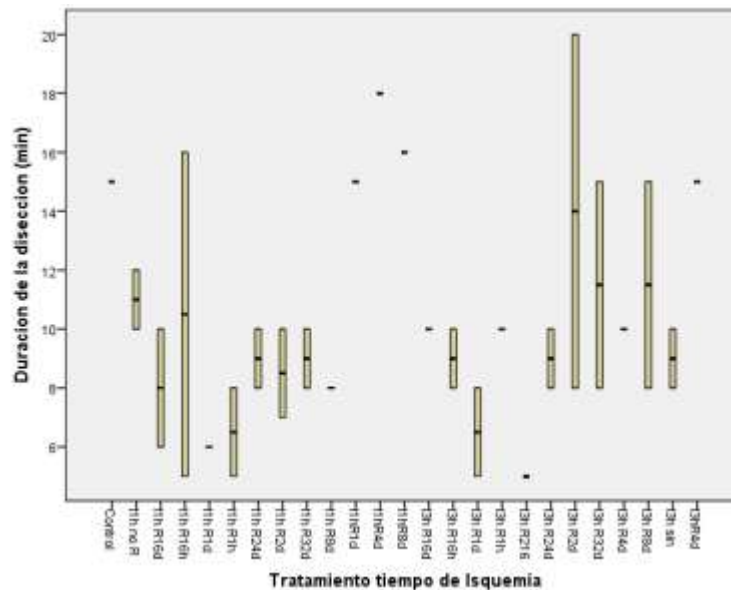


Figura 20. Tiempo en minutos de la duración de la disección; en su mayoría, las medianas se encuentran entre ocho a diez minutos. Mínimo cuatro (4) minutos y máximo 20 minutos. Software de análisis estadístico SPSS versión 22.

9.2 Diferencias en el peso de los biomodelos

La tabla 1 evidencia los pesos iniciales de los biomodelos obtenidos el día en que se realizó el procedimiento de isquemia. La tendencia en las variaciones en el peso se dio hacia los periodos prolongados de reperfusión. En isquemia de una hora en relación con sus tiempos de reperfusión, el peso aumentó entre cinco a 25 gramos en siete de las 21 ratas seleccionadas, mientras que en cinco más, se evidenció reducción del peso entre dos a cinco gramos. Los demás biomodelos no presentaron cambios en el peso.

En isquemia de tres horas y los diferentes periodos de reperfusión, se presentó un aumento desde 10 gramos hasta 110 gramos en cinco biomodelos, por otra parte, la disminución se dio entre 10 a 42 gramos en seis de ellos (Figura 21).

Isquemia de una hora	Edad (meses)	Peso inicial (grms)	Peso el día de la disección (gramos)	Cambio en peso		Isquemia de tres horas	Edad (meses)	peso inicial (grms)	Peso el día de la disección (gramos)	Cambio en peso
C1	12	509	509	0	A	C3	12	498	498	0
E01	4	365	365	0		E03	12	451,5	451,5	0
E02	4	375	375	0		E22	13	530	545	-15
E04	12	409,5	409,5	0		E23	4	350	350	0
E05	4	370	370	0		E24	4	355	355	0
E06	4	346,5	346,5	0		E25	3.1	309,6	309,6	0
E07	12	459,5	459,5	0		E26	4	335	335	0
E08	4	335	335	0		E27	4	350	350	0
E09	12	461	450	11		E28	4	460	460	0
E10	4	400	400	0		E29	3.2	385	400	-15
E11	13	500	485	15		E30	14	555	445	110
E12	13	530	510	20		E31	3.1	299	315	-16
E13	12	472	474	-2		E32	3.2	360	370	-10
E14	12	531	535	-4		E33	12	477,7	480	-2,3
E15	12	446	450	-4		E34	12	515	505	10
E16	13	510	515	-5		E35	3.1	330	370	-40
E17	12	545	519	26		E36	12	528	510	18
E18	13	460	450	10		E37	12	510	500	10
E19	12	490	475	15		E38	13	530	515	15
E20	12	470	465	5		E39	12	460	502	-42
E21	12	418,2	423	-4,8		E40	13	480	480	0

Tabla 1. Diferencias en el peso de cada biomodelo por isquemia y reperfusión. **A.** Cambios de peso en isquemia de una hora. **B.** Cambios de peso en isquemia de tres horas. Los valores positivos indican pérdida en peso y los negativos ganancia.

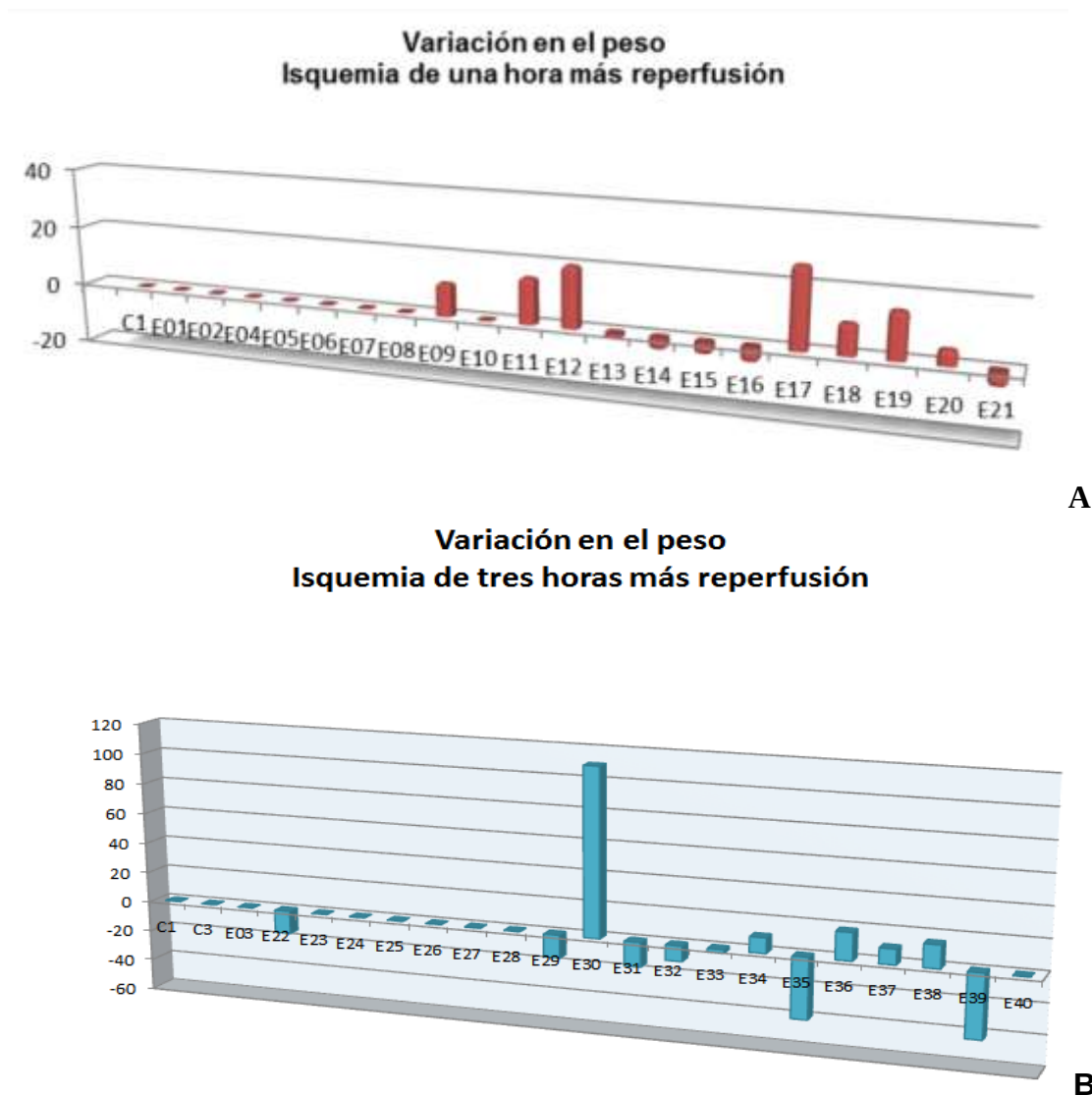


Figura 21. Los cambios en el peso no siguieron un patrón de continuidad; se observa que los biomodelos sometidos a isquemia de tres horas **(B)**, presentan mayores cambios que los sometidos a isquemia de una hora **(A)**.

9.3. Diferencias en el peso de los músculos

Con el fin de establecer la significancia en las diferencias entre los pesos de ambos músculos en isquemia y perfusión, se validaron los supuestos de normalidad, los cuales evidenciaron que los datos no presentan una distribución normal. La prueba estadística utilizada fue Kruskal-Wallis para muestras independientes, que demostró un valor p de 0.506 para el extensor derecho y

para el extensor izquierdo valor p 0.402. Para el soleo izquierdo el valor p fue de 0.826 y para el sóleo derecho valor p de 0.039, significativo para este último.

Peso de los músculos extensor radial largo del carpo derecho (ED) e izquierdo (EI) - miligramos

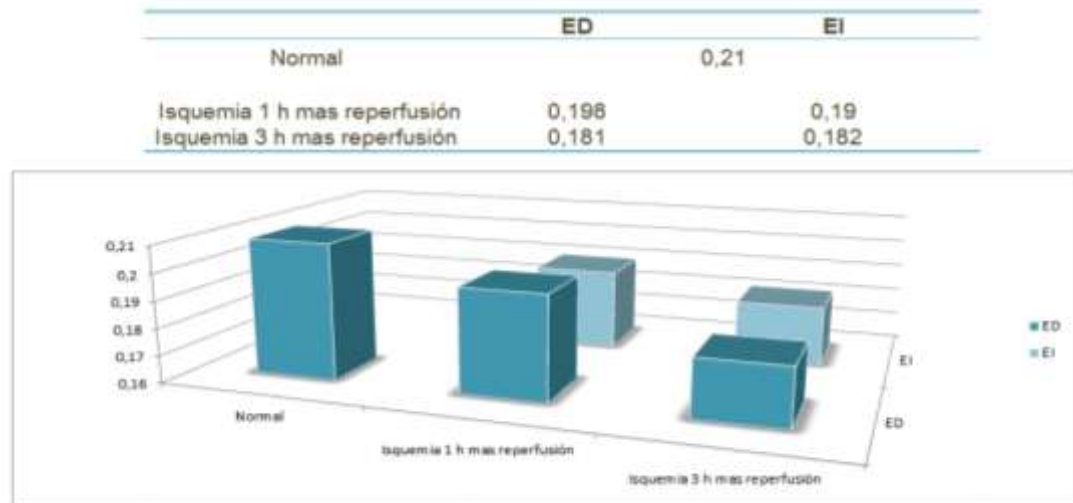


Figura 22. Las diferencias de los pesos entre extensores en cada periodo de isquemia no son significativas. Al comparar los grupos entre sí, se encuentra una disminución progresiva entre uno y dos miligramos en cada período.

Peso de los músculos soleo izquierdo (SI) y soleo derecho (SD)

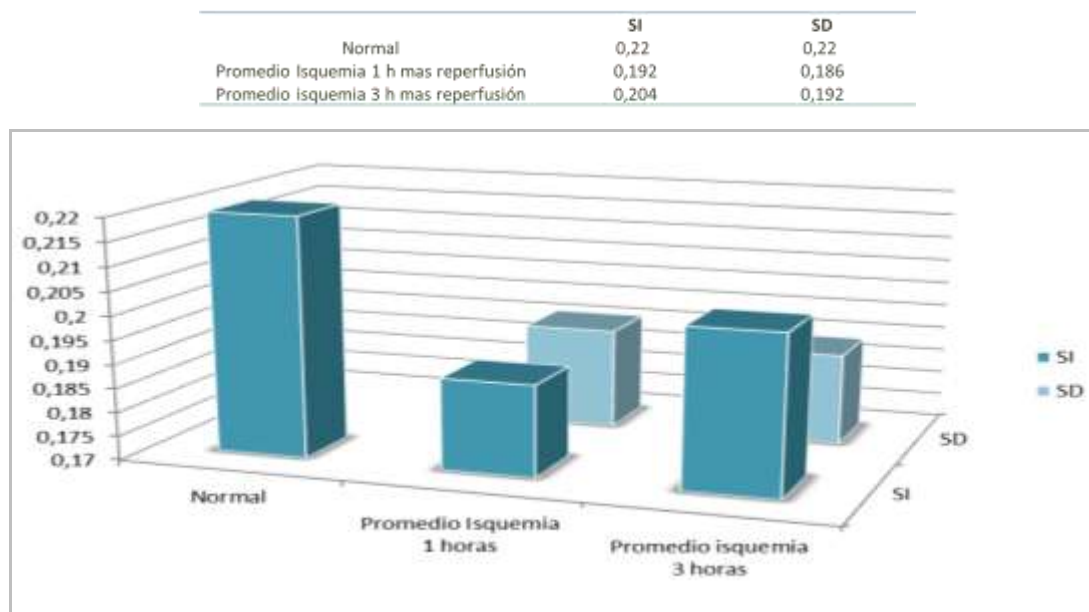


Figura 23. Las diferencias son un poco más notorias al comparar los pesos entre sóleos en cada periodo de isquemia. Entre los grupos se encuentra una disminución inicial en

isquemia de una hora y luego un aumento que no iguala el peso de los músculos del grupo control.

9.4. Pruebas de concordancia intraobservador e interobservador

Se compararon las mediciones realizadas por dos expertos en Histología, con las realizadas por la investigadora en entrenamiento en la misma área. El protocolo de medición se encuentra en el anexo 13.3.6. Estas pruebas se realizaron en dos momentos, el primero para comparar conteos semiautomáticos entre la investigadora y un experto y el segundo, para comparar los tamaños en las regiones de interés entre la investigadora y dos expertos. Las variables que se seleccionaron para la medición fueron:

1. Conteo de fascículos musculares secundarios - número
2. Predominancia de fibras en un fascículo muscular - número
3. Área que ocupa la matriz extracelular intramuscular - micras
4. Área que ocupan las fibras musculares - micras

Estas se clasifican como variables cuantitativas de razón, de modo que para determinar la variabilidad total debida a la variabilidad de los sujetos, la herramienta estadística que aplica es el coeficiente de correlación intraclase (CCI), el cual permite establecer el grado de fiabilidad en las mediciones que realiza un mismo observador y entre las llevadas a cabo por varios observadores expertos en el tema de investigación.

Antes de aplicar el cálculo del CCI se establecieron las hipótesis nula (H_0) y alterna:

H_0 : No existen diferencias significativas en las mediciones intra e interobservador.

H_a : Si existen diferencias.

Dado que el total de imágenes no superó el valor suficiente para aplicar pruebas de estadística paramétrica, el contraste para determinar si la hipótesis nula debe aceptarse o no, se realizó mediante χ^2 de Friedman, es decir, ANOVA no paramétrica, en la que la significancia del valor F debe ser mayor a 0.05.

Después se efectuó la aplicación de los supuestos correspondientes a linealidad y normalidad de los errores (tablas 2 y 3), así como el cálculo del coeficiente de correlación intraclase (CCI).

Linealidad: El valor esperado de los errores es cero		
	N	Media
Standardized Residual	36	,0000000
N válido (por lista)	36	

Tabla 2. Supuesto de normalidad para linealidad. El valor p es significativo, el supuesto se cumple.

Distribución normal Kolmogorov-Smirnov			
	Estadístico	gl	Sig.
Observador 1	,150	14	,200
Observador 2	,181	14	,200

Tabla 3. Supuesto de normalidad para distribución normal

El p-valor del estadístico calculado, es mayor al p-valor de significancia (0.05). Se concluye que los datos se distribuyen de forma normal.

Para conteo de fascículos musculares secundarios y la predominancia en el tipo de fibra en un fascículo muscular, los resultados intra e interobservador fueron: (Tablas 4, 5 y 6):

Investigadora – Intraobservador

Variable	Número imágenes	Chi ² Friedman	Sig	CCI	Valor F	Sig	Valoración
Fascículos musculares	7	0,571	0,45	0,47	1,844	0,23	Mala
Fibras oxidativas	8	2,571	0,109	0,99	341,47	0,000	Muy buena
Fibras intermedias	8	0,18	0,893	0,99	91,42	0,000	Muy buena
Fibras glucolíticas	8	0,744	0,388	0,97	36,53	0,000	Muy buena

Tabla 4. Concordancia Intraobservador para investigadora. Para el conteo de fascículos musculares hay diferencias entre las mediciones. Por otra parte, para el conteo de los tipos de fibras en un fascículo muscular, el coeficiente de correlación intraclase se encuentra por encima del 95%.

Experto – Intraobservador

Variable	Número imágenes	Chi ² Friedman	Sig	CCI	Valor F	Sig	Valoración
<i>Fascículos musculares</i>	7	1,000	0,317	0,65	2,8	0,112	Moderada
<i>Fibras oxidativas</i>	8	2,766	0,096	0,85	8,339	0,006	Buena
<i>Fibras intermedias</i>	8	2,173	0,14	0,94	20,22	0,000	Muy buena
<i>Fibras glucolíticas</i>	8	0,894	0,344	0,92	13,53	0,001	Muy buena

Tabla 5. Concordancia intraobservador para experto. Estos resultados son similares a los obtenidos por la investigadora. Para el conteo de fascículos musculares el valor del coeficiente de correlación intraclase no es significativo; mientras que para el conteo de los tipos de fibras en un fascículo muscular, sí lo es.

Investigadora y Experto – Interobservador

Variable	Número imágenes	Chi ² Friedman	Sig	CCI	Valor F	Sig	Valoración
<i>Fascículos musculares</i>	7	5,158	0,023	0,82	16,371	0,002	Buena
<i>Fibras oxidativas</i>	8	2,301	0,129	0,87	9,322	0,004	Buena
<i>Fibras intermedias</i>	8	0,767	0,381	0,86	6,73	0,01	Buena
<i>Fibras glucolíticas</i>	8	0,249	0,618	0,96	29,54	0,000	Muy buena

Tabla 6. Concordancia Interobservador.

Tanto para la variable conteo de fascículos musculares como el conteo de los tres tipos de fibras en un fascículo, existe significancia en cuanto al valor del coeficiente de correlación intraclase y el estadístico de prueba correspondiente a Chi² de Friedman. En consecuencia, se acepta la hipótesis nula; estadísticamente no se presentan diferencias entre las mediciones de ambos observadores.

En la segunda parte, en las que se obtuvo valores mediante análisis de imágenes, relacionados con mediciones de las áreas que ocupan las fibras musculares y la matriz extracelular intramuscular; los resultados de fiabilidad fueron (tabla 7, 8 y 9) (figuras 24, 25 y 26):

Ambas las variables – Medición intra e Interobservador

Número imágenes	Chi ² Friedman	Sig	CCI	Sig	Valoración
28	2.997	0.223	0.995	0.000	Muy buena

Tabla 7. Prueba de concordancia para variables de áreas que ocupan las fibras musculares y área que ocupa la matriz extracelular intramuscular.

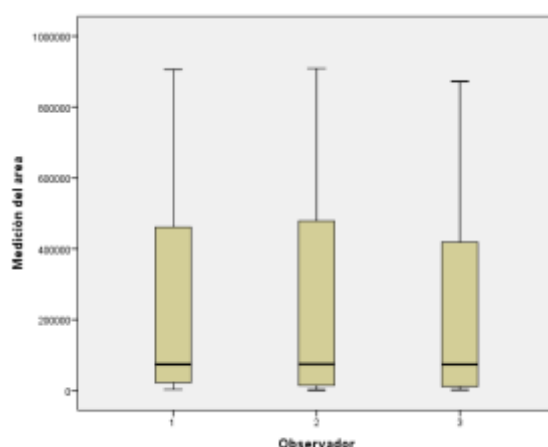


Figura 24. Comparación entre observadores de las mediciones para variables de áreas que ocupan las fibras musculares y área que ocupa la matriz extracelular intramuscular.

Área que ocupa la matriz extracelular intramuscular – Interobservador

Número imágenes	Chi ² Friedman	Sig	CCI	Sig	Valoración
14	1.007	0.604	92.8	0.000	Muy buena

Tabla 8. Prueba de concordancia para el área que ocupa la matriz extracelular intramuscular.

Área que ocupan las fibras musculares - Interobservador

Número imágenes	Chi ² Friedman	Sig	CCI	Sig	Valoración
14	4.569	0.102	99.6	0.000	Muy buena

Tabla 9. Prueba de concordancia para el área que ocupan las fibras musculares.

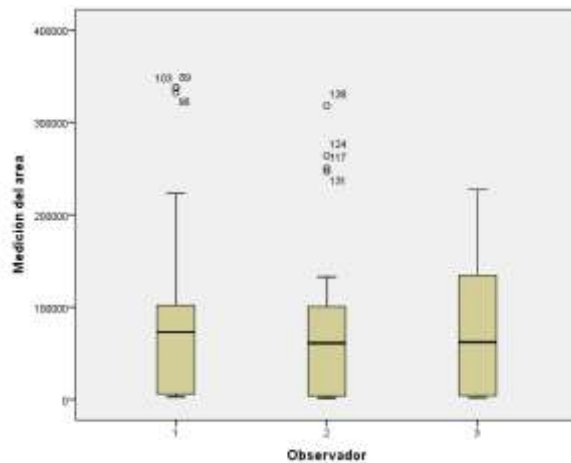


Figura 25. Comparación entre observadores de las mediciones para el área que ocupa la matriz extracelular intramuscular.

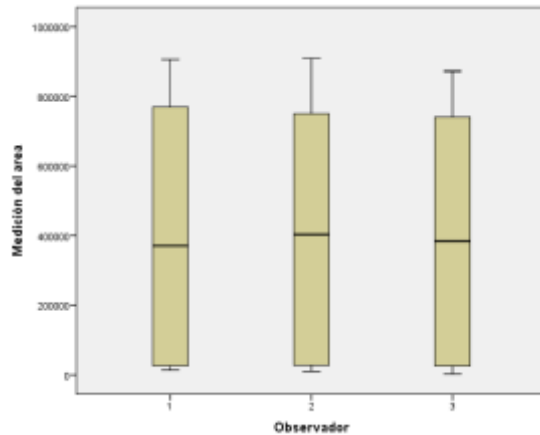


Figura 26. Comparación entre observadores de las mediciones para el área que ocupan las fibras musculares.

Para ambas variables así como de manera independiente, el área que ocupan las fibras musculares y el área que ocupa la matriz extracelular intramuscular, el coeficiente de correlación intraclase estuvo por encima del 90% y su valor $p < 0.05$. El estadístico de prueba, χ^2 de Friedman, también fue significativo, razón por la cual se acepta la hipótesis nula, es decir, no se presentan diferencias en las observaciones entre expertos e investigadora.

Para la predominancia de las fibras, se decidió medir áreas en micras puesto que, presenta una mayor exactitud. Se excluyó del estudio la variable conteo de fascículos musculares secundarios, debido a que genera sesgos en los cambios por reperfusión.

9.5. Validación de los supuestos de normalidad en los datos de Morfometría obtenidos

Prueba de normalidad - Hipótesis:

H_0 : Los residuos presentan una distribución normal

H_a : Los residuos **no** presentan una distribución normal

	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Residuo	,113	58	,05	,968	58	,0132

Tabla 10. Pruebas estadísticas aplicadas para determinación de normalidad en la distribución de los datos.

Dado que $p < 0.05$ se rechazó H_0 . Los datos no presentan distribución normal.

Prueba de linealidad

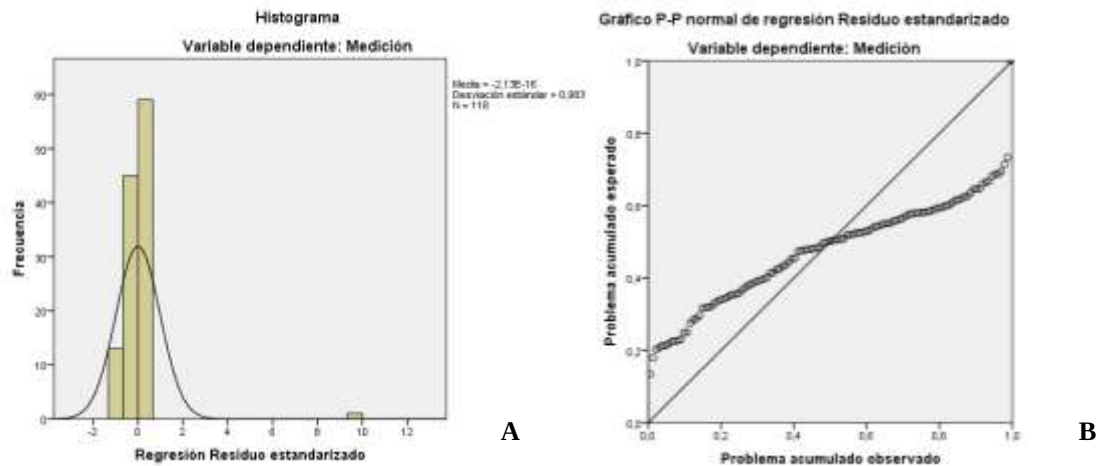


Figura 27. Representación gráfica de la prueba para linealidad. **A.** La curva evidencia que en su mayoría los datos se encuentra distribuidos hacia la izquierda, debido a valores atípicos o extremos. **B.** No se observa linealidad positiva o negativa.

Las gráficas evidenciaron que no se presenta relación lineal entre los residuos. La presencia de datos atípicos o extremos aumenta la variabilidad y determinan una distribución que no es simétrica respecto al promedio. De esta manera, los supuestos de normalidad aplicados sugieren rechazar la hipótesis nula, de modo que, las herramientas de análisis seleccionadas, corresponden a estadística no

paramétrica. La variable a la cual se aplicaron ambos supuestos, corresponde al área que ocupan las fibras musculares.

9.6. Características histoquímicas y morfométricas de los grupos control

Se obtuvo los promedios para las dos mediciones realizadas en 10x y 40x para cada músculo:

Áreas que ocupan las fibras y el tejido conectivo intramuscular

	Extensor radial largo del carpo		Soleo	
	10X	40X	10X	40X
Área que ocupan las fibras musculares	927506	59899	542371	87905
Área que ocupa la matriz extracelular intramuscular	85187	5288	86553	2807

Tabla 11. Tanto en 10x como en 40x en condiciones de normalidad para ambos músculos, la matriz extracelular intramuscular ocupa alrededor de una décima parte en comparación con el área correspondiente a las fibras musculares.

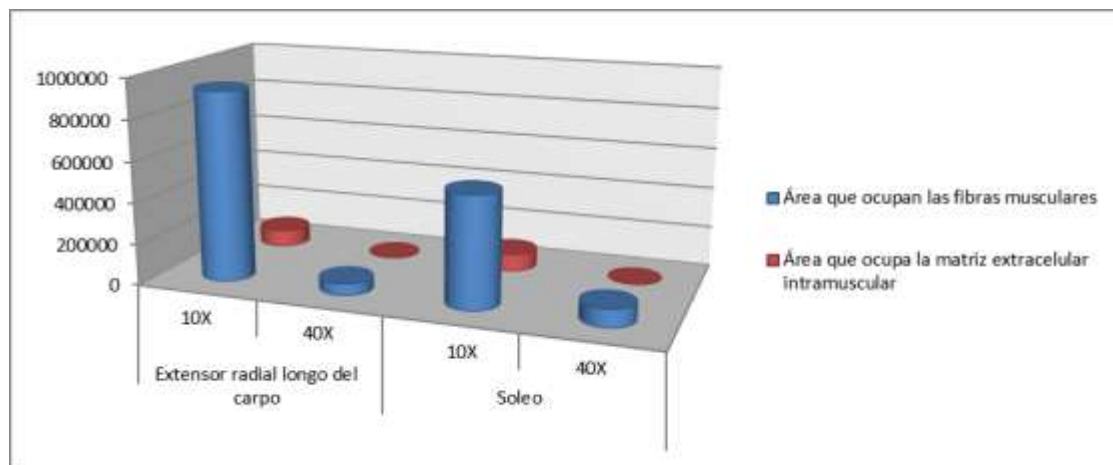


Figura 28. Comparación de áreas entre fibras musculares y matriz extracelular intramuscular para ambos músculos.

El tejido conectivo intramuscular en el aumento 10X es un poco más amplio en el sóleo comparado con el músculo extensor radial largo del carpo. El tamaño de los miocitos en el sóleo en aumento 40x, se observa mayor que en el extensor radial largo del carpo, de ahí las diferencias en la proporción fibras y matriz extracelular.

Predominancia en las fibras según tinción NADH – TR (Tipo de metabolismo)

Extensor radial largo del carpo		Soleo	
	10X	40X	
Oxidativa	59398 (6.5% +/- 2.8)	9263 (15.2% +/- 3.2)	675890 (73.2% +/- 1.0)
			36212 (57.3% +/- 6.7)
Intermedia	293499 (33.6% +/- 3.1)	20987 (34.5% +/- 5.4)	247338 (26.7% +/- 1.0)
			26905 (42.6% +/- 6.7)
Glucolítica	520662 (59.6% +/- 0.3)	30552 (50.2% +/- 8.7)	0
			0

Tabla 12. Predominancia de los tipos de fibras para cada músculo, evidenciado en tinciones para tipo de metabolismo (NADH-TR).

Predominancia en las fibras según tinción mATPasa pH 4.6 (Tipo de contracción)

Extensor radial largo del carpo		Soleo	
	10X	40X	
Lenta	26283 (6.1% +/- 0.8)	1051 (3.9% +/- 0.2)	114835 (67.6% +/- 4.6)
			9076 (38.5% +/- 0.9)
Intermedia	171174 (53.7% +/- 1.8)	17571 (30.3% +/- 3.6)	54871 (32.3% +/- 4.6)
			14481 (61.4% +/- 0.9)
Rápida	229265 (40.0% +/- 0.9)	8125 (65.7% +/- 4.9)	0
			0

Tabla 13. Predominancia de los tipos de fibras para cada músculo, evidenciado en tinciones para velocidad de contracción (mATPasa).

En el músculo extensor radial largo del carpo, la predominancia normal es de fibras glucolíticas y de contracción rápida (tipo IIB), mientras que en el sóleo es de fibras oxidativas y de contracción lenta (tipo I).

En condiciones de normalidad no se presenta infiltración celular en el tejido conectivo ni al interior de los miocitos; la forma de la célula que predomina en cortes transversales es hexagonal con núcleos localizados periféricamente. No se presenta necrosis, miotubos, desorganización del citoesqueleto ni vacuolas citoplasmáticas.

9.7. Características histoquímicas y morfométricas de los grupos experimentales

Las variables se agruparon en cuatro categorías. La primera corresponde a la distribución de las fibras musculares esqueléticas; la segunda a la distribución de la matriz extracelular; la tercera a la predominancia de las fibras, que incluye oxidativas o tipo I, intermedias y glucolíticas o tipo IIB, tanto en NADH-TR como en mATPasa; la cuarta corresponde a los cambios de lesión que incluye infiltración celular, localización de los núcleos, cambios citoplasmáticos, cambios en la forma, necrosis y regeneración celular.

Se llevaron a cabo las comparaciones de los cambios en los períodos de reperfusión, en aumento 10x y 40x de manera independiente y para cada músculo.

A su vez, para el extensor radial largo del carpo y el sóleo, se compararon los cambios durante la reperfusión seguida a una hora de isquemia, luego durante la reperfusión seguida a tres horas de isquemia y se termina con la comparación de los grupos entre una y tres horas.

9.7.1. Distribución de las fibras musculares esqueléticas

9.7.1.1. En una hora de isquemia

En aumento 10x para el músculo extensor radial largo del carpo se observa disminución del área que ocupan las fibras musculares en los diferentes períodos de reperfusión, en relación con el control. Esta reducción no se presenta a las 16 horas, tiempo en el cual el valor medido es mayor pero cercano al normal. Las comparaciones entre los grupos de reperfusión en el mismo aumento no evidenciaron que las diferencias fueron significativas, valor p 0.196.

En aumento 40x, todas las medianas en los períodos de reperfusión son inferiores al valor correspondiente al grupo control. Las comparaciones entre los grupos de reperfusión tampoco mostraron significancia en sus diferencias, valor p 0.861.

En el músculo sóleo en aumento 10x, las medianas superan en su mayoría el valor normal, excepto en cero horas, una hora y ocho días de reperfusión. La comparación entre los períodos de reperfusión no evidencia que las diferencias sean significativas, valor p 0.073.

En aumento 40x las medianas de los grupos de reperfusión no superan el valor correspondiente al control. Este aspecto está dado por las características del campo microscópico presentes en la imagen. Las comparaciones entre los períodos de reperfusión tampoco evidencian que las diferencias son significativas, valor p 0.464.

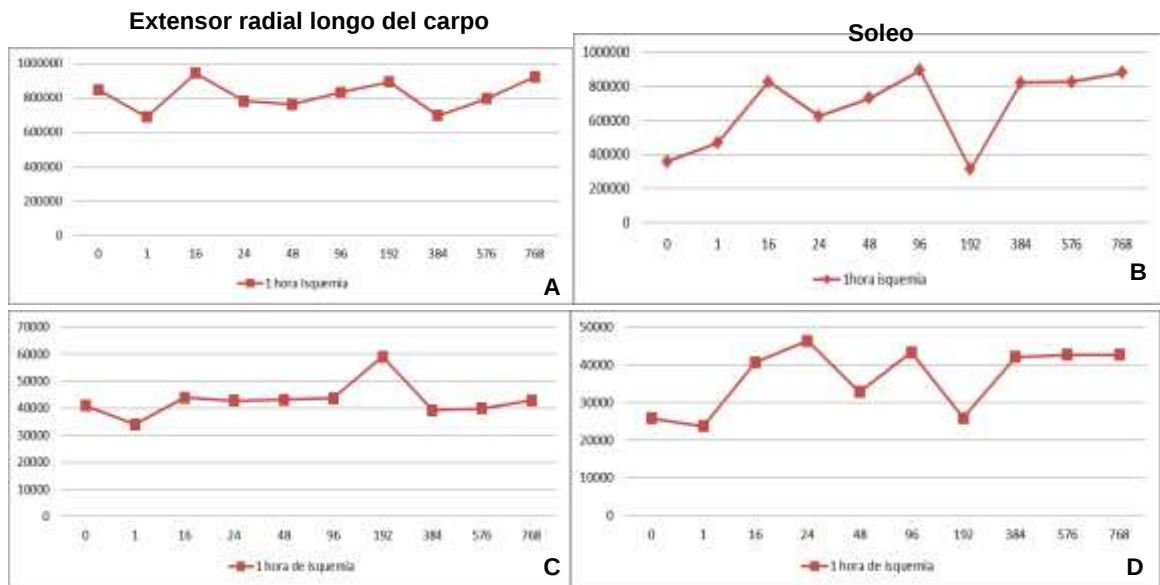


Figura 29. Medianas correspondientes a los tiempos de reperfusión seguidos a una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Extensor radial longo del carpo en 10x. Los valores se encuentran en rangos similares en donde no se observan grandes variaciones entre reperfusión cero y 32 días. **B.** Músculo sóleo en 10x. Se observan cambios en las áreas en los diferentes periodos de reperfusión, en los que sigue una tendencia en aumento, excepto a los ocho días (192 horas) de reperfusión. **C.** Músculo extensor radial longo del carpo en 40x. Conserva áreas similares en los diferentes períodos de reperfusión. **D.** Músculo sóleo en 40x. La tendencia que sigue la curva es similar a la observada en aumento 10x.

9.7.1.2. En tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial longo del carpo en aumento 10x, todos los valores son inferiores al normal. Entre los períodos de reperfusión en el mismo aumento, se encontraron que las diferencias son significativas a las 16 horas, 24 horas y 32 días (768 horas) de reperfusión, valor p 0.004.

En aumento 40x, aunque las medianas de las áreas son inferiores al control, los valores se encuentran cercanos al normal, con excepción de reperfusión de 16 horas, cuatro días (96 horas) y 16 días (384 horas); periodos en los que se presentan los valores más bajos. Las comparaciones entre los períodos de reperfusión evidenciaron que las diferencias son significativas, valor p 0.005. Estas se encuentran a las 16 horas y 32 días de reperfusión.

En el músculo sóleo en aumento 10x, las medianas son superiores al control, excepto en reperfusión de cero horas, 24 horas y ocho días. Las diferencias fueron significativas entre los períodos de reperfusión, valor p 0.0168.

En aumento 40x, todos los valores en los grupos de reperfusión son inferiores al establecido como normal. No se encontró que las diferencias son significativas al comparar entre sí los diferentes períodos de reperfusión, valor p 0.758.

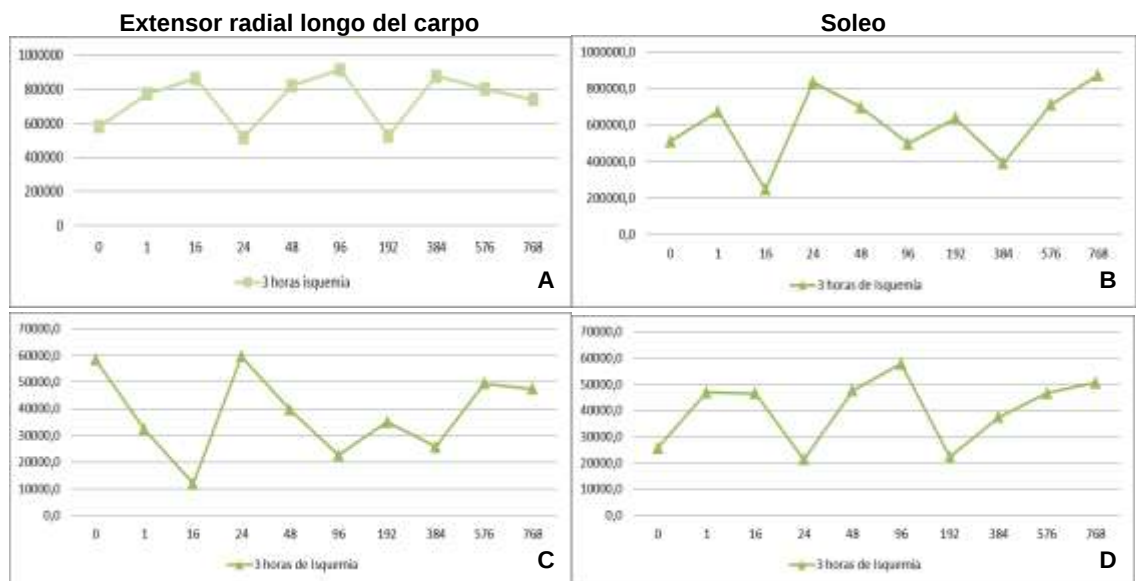


Figura 30. Medianas correspondientes a los tiempos de reperfusión seguidos a tres horas de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Se observan áreas similares excepto a las 24 horas y a los ocho días (192 horas). **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. Nótese las diferencias entre reperfusión de 16 horas con 24 horas y con 32 días (768 horas). **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. El menor valor se observa a las 16 horas, mientras que los más elevados se encuentran en cero horas y en 24 horas de reperfusión. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Se conservan las fluctuaciones en las áreas que se observaron en B.

9.7.1.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, la comparación entre una y tres horas de isquemia evidenció que las diferencias fueron significativas a las 16 horas, con un valor $p = 0.000$.

En el músculo sóleo, no se presentaron diferencias significativas al comparar los periodos de reperfusión seguidos a una y tres horas de isquemia, valor $p = 0.066$.

En aumento 40x para ambos músculos no se encontraron diferencias significativas en el área que ocupan las fibras musculares entre isquemia de una y tres horas, en relación con los diferentes periodos de reperfusión, valor $p > 0.005$.

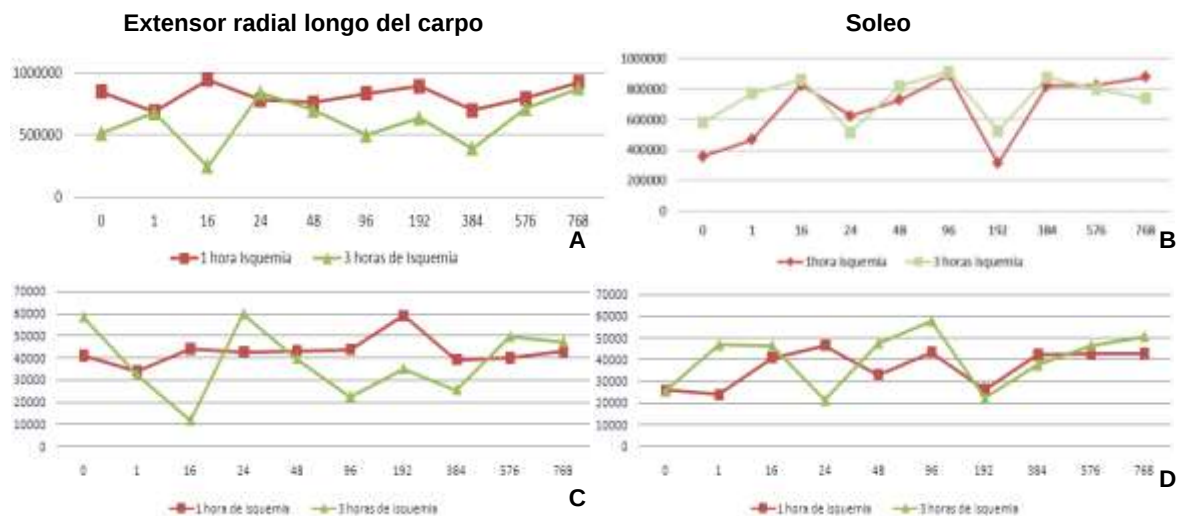


Figura 31. Comparación de las medianas en el área que ocupan las fibras musculares entre una y tres horas de isquemia en relación con la reperfusión. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Musculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Se observa una reducción de la proporción de fibras musculares en los músculos de los biomodelos sometidos a tres horas de isquemia con 16 horas y 16 días de reperfusión (384 horas). **B.** Musculo soleo en el mismo aumento, tiende a una disminución cuando es sometido a una hora de isquemia y ocho días de reperfusión (192 horas). **C.** Musculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. Se mantiene el patrón de reducción de fibras musculares en los músculos de los biomodelos sometidos a tres horas de isquemia con 16 horas reperfusión. **D.** Musculo soleo en el mismo aumento, el patrón observado es similar en los periodos de reperfusión posteriores a una y tres horas de isquemia.

<i>Extensor radial largo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1h	3h	Diferencia	Reperusión	1h	3h	Diferencia
Control	927506	927506	0	Control	542371	542371	0
0 horas	847046,5	510221,5	336825,0	0 horas	357900,9	580729,5	-222828,6
1 hora	688756,4	675160,7	13595,7	1 hora	467350,05	771252,0	-303902,0
16 horas	942989	245994,8	696994,3	16 horas	827263,9	862604,5	-35340,6
24 horas	781145,45	835323,5	-54178,1	24 horas	624530,30	517149,8	107380,6
2 días	761194,35	698619,7	62574,7	2 días	729406,35	820984	-1563754,9
4 días	830861,9	498597,0	332264,9	4 días	894446,45	915036,0	-20589,6
8 días	891017,35	636492,0	254525,4	8 días	314071,25	525729,0	-211657,7
16 días	695992,8	390640,7	305352,1	16 días	822519,05	878558,3	-56039,3
24 días	794832,6	711135,5	83697,1	24 días	827044,5	803652,5	23392,0
32 días	920998,5	874184,3	46814,2	32 días	879111,5	739659,5	139452,0

Tabla 14. Medición de las medianas y sus diferencias en el área que ocupan las fibras musculares en ambos músculos en aumento 10x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

<i>Extensor radial largo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1h	3h	Diferencia	Reperusión	1h	3h	Diferencia
Control	59899	59899	0	Control	87905	87905	0
0 horas	40962,97	58417,3	-17454,3	0 horas	25862,337	25666,4	195,9
1 hora	34044,11	32334,3	1709,9	1 hora	23743,442	46884,5	-23141,1
16 horas	43971,23	11849,7	32121,6	16 horas	40655,145	46490,7	-5835,5
24 horas	42688,89	59741,7	-17052,9	24 horas	46363,615	21347,0	25016,6
2 días	43078,88	39687,8	3391,1	2 días	32855,715	47550,0	-14694,3
4 días	43630,36	22539,3	21091,1	4 días	43361,365	57775,0	-14413,6
8 días	59089,31	35080,0	24009,3	8 días	25958,45	22230,2	3728,3
16 días	39285,98	25671,5	13614,5	16 días	42143,475	37535,5	4608,0
24 días	39855	49559,2	-9704,2	24 días	42666	46570,0	-3904,0
32 días	42866	47376,8	-4510,8	32 días	42707,5	50641,6	-7934,1

Tabla 15. Medición de las medianas y sus diferencias en el área que ocupan las fibras musculares en ambos músculos en aumento 40x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

9.7.2. Distribución de la matriz extracelular intramuscular

9.7.2.1. En una hora de isquemia

Para el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, se observó aumento en el espacio que ocupa el tejido conectivo. Al realizar las comparaciones entre los períodos de reperfusión, se determinó que las diferencias no son estadísticamente significativas, valor p 0.158.

En aumento 40x, las medianas tienden a ser superiores a la del grupo control. El valor más alto se encontró en reperfusión de una hora. Los períodos de 16 horas, 24 horas, dos días, cuatro días y 32 días fueron inferiores pero cercanos al valor normal. La comparación entre los grupos de reperfusión indicó que las diferencias no son significativas, valor p 0.917.

En el músculo sóleo en aumento 10x, se evidenció mayor incremento en el espacio que ocupa la matriz extracelular. Las comparaciones entre sí mostraron que las diferencias no fueron significativas, valor p 0.066.

En aumento 40x, todas las medianas durante la reperfusión son mayores a la del grupo control. Las comparaciones entre los grupos evidenciaron que las diferencias no fueron estadísticamente significativas, valor p 0.443.

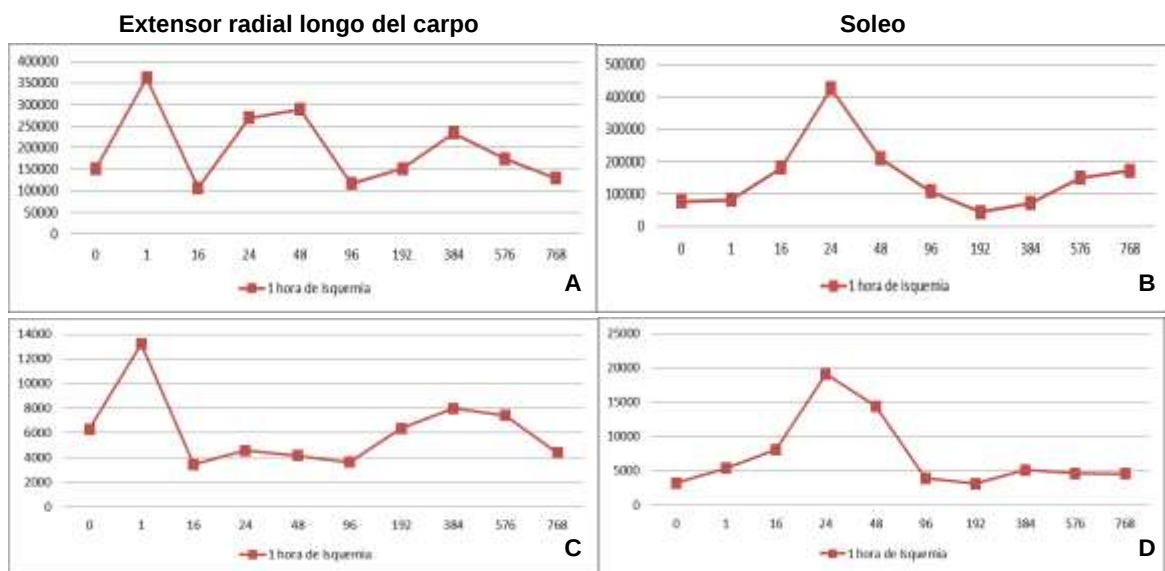


Figura 32. Medianas correspondientes a los tiempos de reperusión seguidos de una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Nótese el aumento en el área en reperusión de una hora, 24 horas y 48 horas. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. No se observan fluctuaciones en la gráfica, excepto el pico que indica el aumento en el área del conectivo a las 24 horas de reperusión. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. Se evidencia el aumento en una hora de reperusión sin cambios drásticos en los demás grupos de reperusión. **D.** Músculo sóleo. Continúa la tendencia en cuanto al pico a las 24 horas de reperusión. No se observa variaciones mayores en las áreas.

9.7.2.2. En tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, se observó que todos los períodos de reperusión presentaron áreas superiores a las del grupo control, con excepción de 24 horas y 16 días de reperusión. La comparación de las medianas entre los grupos de reperusión indicó que las diferencias son estadísticamente significativas, valor p 0.002.

En aumento 40x, también se observó aumento en todas las medianas, excepto cero horas y 16 días de reperusión. Al compararlas entre sí, se estableció que existen diferencias significativas cuando se presenta tres horas de isquemia entre los ocho días (192 horas) y 16 días (384 horas), valor p 0.054.

En el músculo sóleo en aumento 10x, se evidenció que todas las áreas medidas son mayores a las del grupo control. Fue posible determinar que existieron

diferencias significativas a los cuatro días (96 horas) de reperfusión, así como una hora de isquemia con 24 horas de reperfusión, valor p 0.0467.

En aumento 40x también son mayores las áreas de reperfusión en relación con el control. Las comparaciones entre sí evidenciaron que las diferencias no son significativas, valor p 0.953.

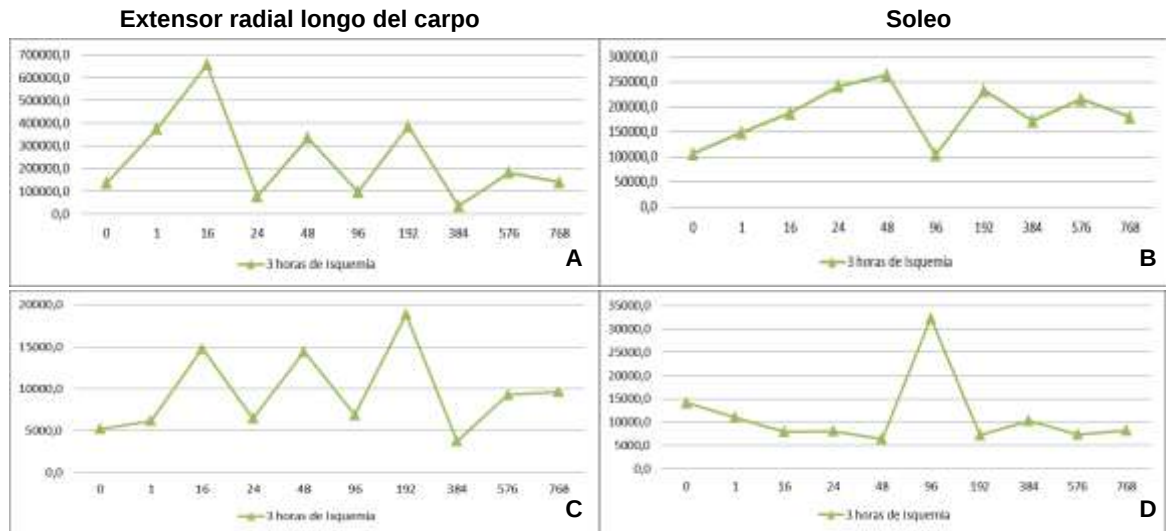


Figura 33. Medianas correspondientes a los tiempos de reperfusión seguidos de tres horas de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Se observan incrementos notorios a las 16 horas, 48 horas y ocho días (192 horas). **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. Se observa reducción en el área a los cuatro días (96 horas) de reperfusión. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. La tendencia en la gráfica es similar a la observada en 10x. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Presenta variación en relación a la gráfica observada en 10x. A los cuatro días se observa aumento en el área, aspecto determinado por las características del campo microscópico.

9.7.2.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x y 40x, las diferencias no son significativas, valor $p > 0.05$.

En el músculo sóleo en aumento 10x y 40x, entre los periodos de reperfusión seguidos a una hora y tres horas de isquemia, no se observaron diferencias significativas, valor $p > 0.05$.

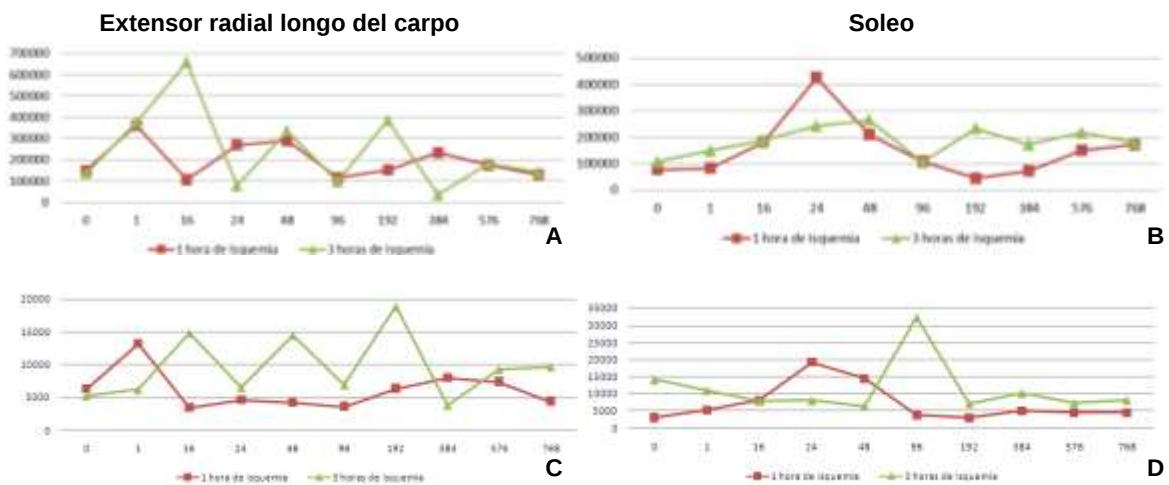


Figura 34. Comparación de las medianas en el área que ocupa la matriz extracelular intramuscular entre una y tres horas de isquemia en relación con la reperfusión. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Musculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Se observa un aumento en tres horas de isquemia con 16 horas y ocho días (192 horas) de reperfusión. **B.** Musculo soleo en el mismo aumento, tiende a un incremento cuando es sometido a una hora de isquemia y 24 horas de reperfusión. **C.** Musculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. Se observa variación en la gráfica correspondiente a tres horas de isquemia con aumentos a las 16 horas, 48 horas y 8 días, así como disminución a los 16 días (384 horas) de reperfusión. **D.** Musculo soleo en el mismo aumento, el patrón observado es similar en una y tres horas de isquemia, a excepción de un incremento a los cuatro días (96 horas de reperfusión).

Extensor radial longo del carpo (um)

Reperusión	1h	3h	Diferencia
Control	85187	85187	0
0 horas	150107,08	136098,8	14008,3
1 hora	361497,45	375091,0	-13593,6
16 horas	107264,92	658389,5	-551124,6
24 horas	269108,45	78247,9	190860,6
2 días	289059,55	335542,3	-46482,8
4 días	116368,5	97199,7	19168,8
8 días	151688,41	386634,5	-234946,1
16 días	233804,97	35788,3	198016,6
24 días	174753,65	182597,0	-7843,4
32 días	129253,5	141401,7	-12148,2

Soleo (um)

Reperusión	1h	3h	Diferencia
Control	86553	86553	0
0 horas	76556,38	105859,0	-2930,6
1 hora	81204,851	148148,7	-66943,8
16 horas	181118,2	187643,8	-6525,5
24 horas	425723,61	241364,8	184358,9
2 días	209689,8	264000,0	-54310,2
4 días	107988,72	103846,7	4142,1
8 días	43869,1255	232787,0	-188917,9
16 días	71099,875	171693,3	-100593,5
24 días	149936	215781,0	-65845,0
32 días	171140	179428,5	-8288,5

Tabla 16. Medición de las medianas y sus diferencias del área que ocupa la matriz extracelular intramuscular en ambos músculos en aumento 10x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

Extensor radial longo del carpo (um)

Reperusión	1h	3h	Diferencia
Control	5288	5288	0
0 horas	6298,56	5217,2	1081,4
1 hora	13217,42	6179,7	7037,7
16 horas	3440,3	14795,3	-11355,0
24 horas	4572,655	6458,6	-1886,0
2 días	4182,65	14436,3	-10253,6
4 días	3631,175	6881,6	-3250,4
8 días	6349,74	18858,7	-12508,9
16 días	7975,55	3748,5	4227,1
24 días	7404,6	9284,4	-1879,8
32 días	4394	9627,0	-5233,0

Soleo (um)

Reperusión	1h	3h	Diferencia
Control	2807	2807	0
0 horas	3221,69	14154,9	-10933,2
1 hora	5340,58	11002,0	-5661,4
16 horas	8106,395	7941,0	165,4
24 horas	19075,44	8074,0	11001,4
2 días	14405,82	6389,3	8016,5
4 días	3900,17	32296,8	-28396,6
8 días	3099,055	7190,0	-4090,9
16 días	5117,55	10274,5	-5157,0
24 días	4594	7370,0	-2776,0
32 días	4553	8201,6	-3648,6

Tabla 17. Medición de las medianas y sus diferencias del área que ocupa la matriz extracelular intramuscular en ambos músculos en aumento 40x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

9.7.3. Distribución de la predominancia según el tipo de fibra

Tanto en el extensor radial largo del carpo como el sóleo en tinciones de histoquímica enzimática, se presentaron aumentos en el área de un determinado tipo de fibra muscular. Se analizó el área ocupada por las fibras oxidativas (contracción lenta), intermedias y glucolíticas (contracción rápida), en ambos músculos y en aumentos 10x y 40x. Se determinaron los cambios en la predominancia de cada una, secundarios a isquemia de una y tres horas en relación con los diferentes períodos de reperfusión.

9.7.3.1. Tinción nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolium reductasa (NADH-TR)

9.7.3.1.1. Fibras oxidativas

9.7.3.1.1.1. En una hora de isquemia

Para el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, se observó aumento en todos los períodos de reperfusión en relación con el control, con excepción de los períodos de reperfusión cortos de 24 horas y cuatro días. La comparación de los grupos entre sí demostró diferencias significativas, valor p 0.027.

En aumento 40x, se observa también un aumento que supera el área determinada en el control; las excepciones se encuentran a las 24 horas y dos días; de la misma manera, al comparar las medianas entre los períodos de reperfusión, se encontró que las diferencias son significativas, valor p 0.027.

En el músculo sóleo en aumento 10x, las áreas fueron inferiores en relación con el control, excepto a las 16 horas y 24 horas. La comparación de los períodos de reperfusión entre sí evidenció que las diferencias son significativas, valor p 0.026.

En aumento 40x, también se observó disminución en las áreas correspondientes a cero horas, dos días, 16 días, 24 días y 32 días de reperfusión, en los demás grupos las áreas fueron superiores al valor normal. Al realizar la comparación entre las medianas, se encontraron diferencias significativas valor p 0.026.

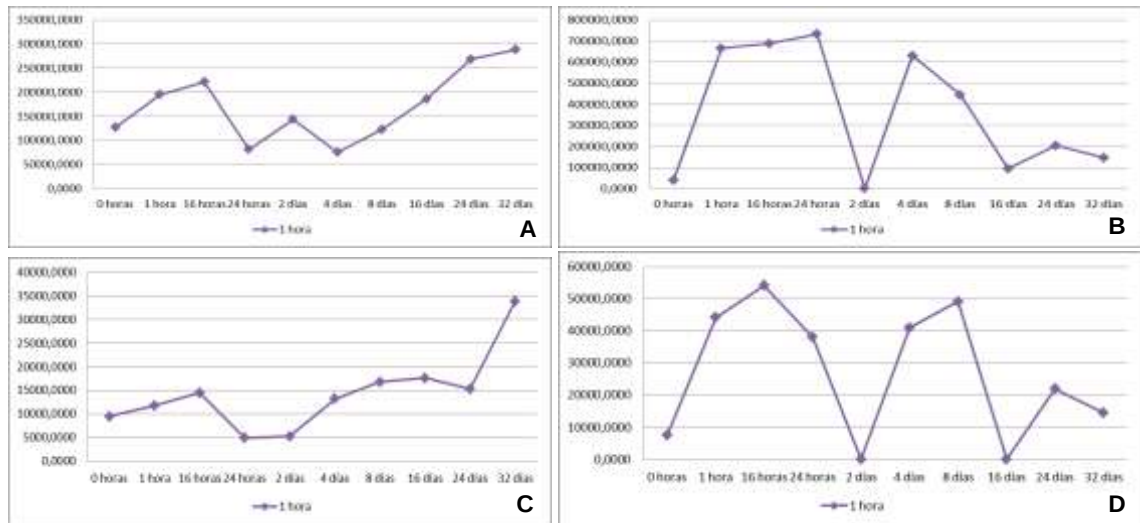


Figura 35. Comparación de las medianas en el área de las fibras oxidativas entre los períodos de reperusión que siguieron a una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. La tendencia es al aumento en el área de fibras oxidativas. Nótese la diferencia entre cero horas y 32 días de reperusión. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. Se observa fluctuación entre las áreas. En los períodos prolongados de reperusión, el valor del área es similar al encontrado en cero horas y al valor normal. **C.** Musculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. La tendencia oxidativa es similar a la observada en 10x. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Los cambios por aumento y disminución en las áreas correspondientes son similares a los encontrados en aumento 10x.

9.7.3.1.1.2. En tres horas de isquemia

Para el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, todas las áreas son superiores a la determinada en el músculo control. Las diferencias entre los períodos de reperusión fueron significativas, valor p 0.038.

En aumento 40x, se observó también un incremento en las áreas, exceptuando 16 horas y ocho días de reperusión. Se encontraron diferencias en la distribución de las medianas correspondiente a los períodos de reperusión, valor p 0.045.

En el músculo sóleo en aumento 10x, todas las áreas presentaron disminución en relación con el control. Se evidenció diferencias significativas entre los grupos de reperusión, valor p 0.05.

En aumento 40x, todas las áreas presentaron disminución excepto en cero horas de reperfusión. La comparación entre las medianas de los periodos de reperfusión seguidos de isquemia de tres horas, evidenció que las diferencias son significativas, valor p 0.026.

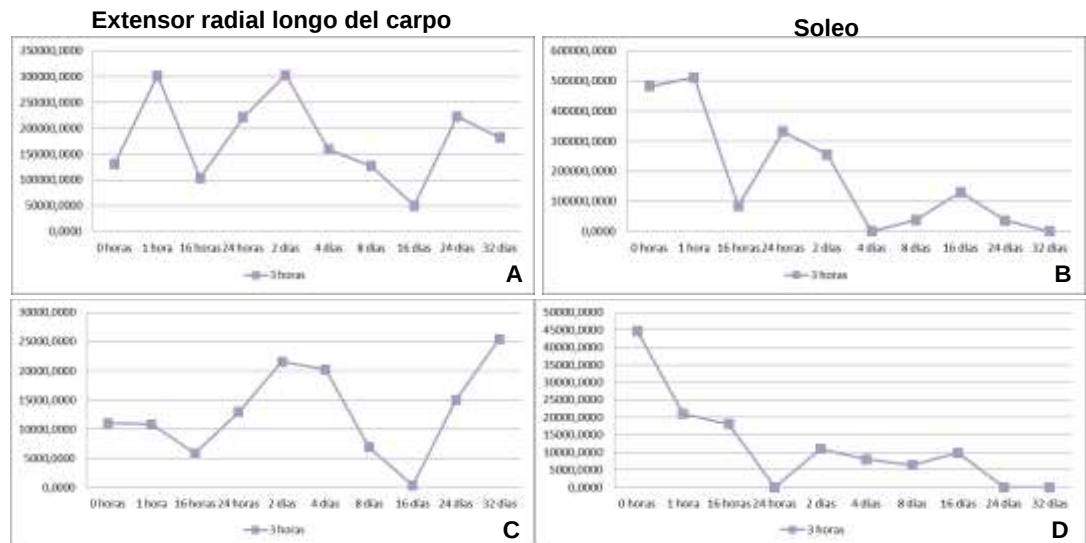


Figura 36. Comparación de las medianas en el área de las fibras oxidativas entre los periodos de reperfusión que siguieron a tres horas de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Se observa cambios importantes en las áreas entre los grupos de reperfusión. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. La tendencia de fibras oxidativas se da hacia la disminución. Nótese la diferencia entre reperfusión de una hora y 32 días. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. En los periodos prolongados de reperfusión la gráfica evidencia aumento en la predominancia oxidativa. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Presenta variaciones parecidas a las observadas en 10x para el mismo músculo.

9.7.3.1.1.3. Comparación entre una hora y tres horas de isquemia

Las fibras oxidativas en el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x y 40x, no presentaron diferencias significativas entre las medianas de isquemia de una y tres horas seguido de perfusión, valor $p > 0.05$.

Para el músculo sóleo en aumento 10X, la distribución de fibras oxidativas presenta diferencias significativas entre las medianas de isquemia de una y tres horas con sus tiempos de perfusión, valor $p = 0.037$. Las diferencias se encontraron entre isquemia de una hora y perfusión de una hora, con isquemia de tres horas y perfusión de cero horas, dos días, ocho días, 16 días, 24 días y 32 días; isquemia de una hora y perfusión de 16 horas con isquemia de tres horas y perfusión de dos días, 16 días, 24 días y 32 días; isquemia de una hora y 24 horas de perfusión con todos, excepto isquemia de tres horas con perfusión de una hora y 16 horas, e isquemia de una hora y perfusión de cuatro días con isquemia de tres horas y perfusión de una hora, 24 horas y 32 días.

En aumento 40X, se observaron diferencias significativas en la distribución de las medianas de las fibras oxidativas, valor $p = 0.029$ entre una y tres horas de isquemia, específicamente en isquemia de una hora y perfusión de cero horas con todos los periodos de perfusión seguidos a isquemia de tres horas, excepto cuatro y ocho días; isquemia de una hora y perfusión de una hora con todos los periodos de perfusión seguidos a tres horas de isquemia excepto 16 horas; isquemia de una hora y perfusión de 24 horas, con todos los periodos de perfusión seguidos a tres horas de isquemia sin excepción; isquemia de una hora y perfusión de dos días, presenta diferencias con todos, excepto isquemia de tres horas con 16 días y 32 días de perfusión; isquemia de una hora y perfusión de cuatro días, con todos excepto isquemia de tres horas y perfusión de cero horas y ocho días y, en isquemia de una hora y perfusión de 32 días excepto con isquemia de tres horas y perfusión de dos, 16 y 24 días.

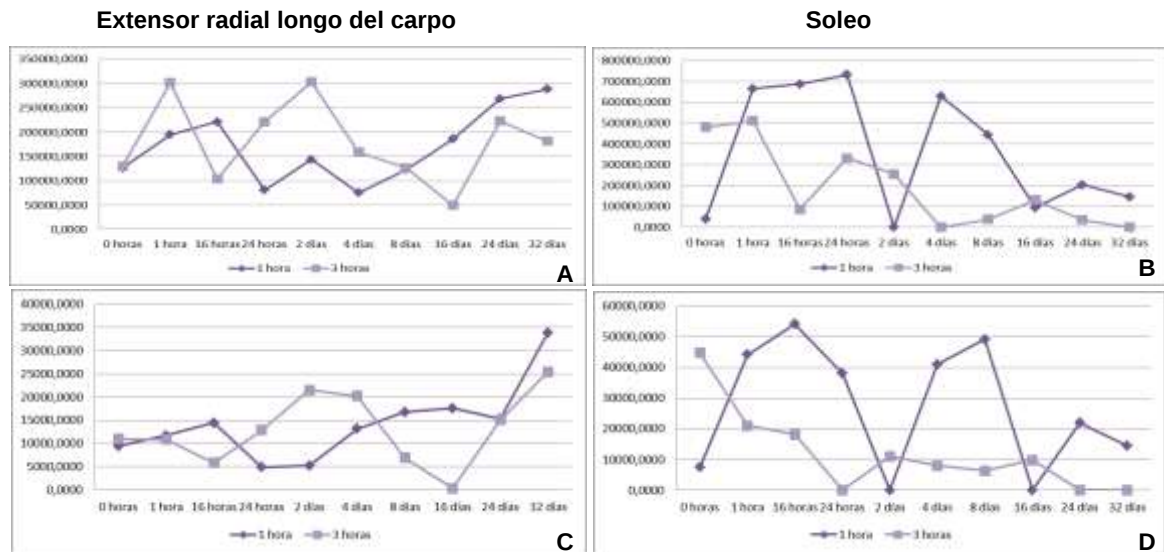


Figura 37. Comparación de las medianas en el área que ocupan las fibras oxidativas, medidas en tinción NADH-TR. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Los tiempos cortos de reperusión seguidos a una hora de isquemia difieren de los demás períodos seguidos a tres horas de isquemia, en especial los prolongados. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. Los cambios por reperusión tienden a ser mayores en isquemia de tres horas **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. La diferencia es notoria en reperusión de dos días y 16 días. **D.** Músculo soleo en aumento 40x. La curva se comporta de la misma manera. Las diferencias más evidentes se dan entre períodos cortos y prolongados.

<i>Extensor radial longo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	Reperusión	1 h	3 h	Diferencia
Control	59368	59398	0	Control	675890	675890	0
0 horas	126964,50	130420,00	3455,5	0 horas	38211,80	481561,00	443349,2
1 hora	194803,25	301992,85	107189,6	1 hora	666030,75	511487,50	-154543,3
16 horas	221301,00	103777,70	-117523,3	16 horas	687997,80	85040,50	-602957,3
24 horas	81386,57	221357,95	139971,4	24 horas	733007,20	331716,00	-401291,2
2 días	143866,75	303199,95	159333,2	2 días	0,00	255394,55	255394,6
4 días	75839,10	159187,15	83348,1	4 días	630492,10	0,00	-630492,1
8 días	123043,50	126722,73	3679,2	8 días	444159,00	37746,97	-406412,0
6 días	185905,90	49713,27	-136192,6	16 días	93454,58	130265,25	36810,7
24 días	268820,35	223205,80	-45614,6	24 días	203681,70	35163,29	-168518,4
32 días	288337,00	181752,60	-106584,4	32 días	145529,10	0,00	-145529,1

Tabla 18. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras oxidativas, tinción NADH-TR en ambos músculos en aumento 10x. Se compara una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

<i>Extensor radial longo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	Reperusión	1 h	3 h	Diferencia
Control	9263	9263	0	Control	36212	36212	0
0 horas	9405,45	11029,74	1624,295	0 horas	7443,35	44747,49	37304,140
1 hora	11774,51	10849,31	-925,195	1 hora	44128,50	21006,00	-23122,500
16 horas	14436,00	5843,59	-8592,405	16 horas	54150,57	18136,92	-36013,655
24 horas	4898,65	12906,41	8007,751	24 horas	38084,86	0,00	-38084,860
2 días	5201,20	21551,45	16350,24	2 días	0,00	11029,35	11029,355
4 días	13190,22	20231,95	7041,735	4 días	41040,24	7985,00	-33055,240
8 días	16784,38	6902,36	-9882,020	8 días	49158,25	6371,34	-42786,905
16 días	17598,01	12407	-17255,49	16 días	0,00	9847,32	9847,320
24 días	15274,94	15042,05	-232,885	24 días	21926,95	0,00	-21926,955
32 días	33810,04	25394,84	-8415,205	32 días	14535,01	0,00	-14535,015

Tabla 19. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras oxidativas, tinción NADH-TR en ambos músculos en aumento 40x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

9.7.3.1.2. Fibras glucolíticas

9.7.3.1.2.1. En una hora de isquemia

Para el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, se observó disminución en la distribución de las medianas en relación con el grupo control. La comparación de los grupos de reperfusión evidenció que las diferencias no son significativas, valor $p > 0.05$.

En aumento 40x, las áreas también fueron inferiores a la establecida como normal. Al comparar las medianas de los períodos de reperfusión seguidos de una hora de isquemia, se encuentran diferencias significativas en las áreas de las fibras glucolíticas, valor $p = 0.034$.

En el músculo sóleo en aumento 10x, el valor normal es cero fibras glucolíticas. Durante la morfometría hubo presencia de fibras glucolíticas en cero horas, dos días, 16 días, 24 días y 32 días de reperfusión. Al comparar entre sí los períodos de reperfusión se observó diferencias significativas, valor $p = 0.026$.

En aumento 40x, el valor de normalidad es cero. La presencia de fibras glucolíticas se identificó en cero horas, dos días, 16 días y 24 días de reperfusión. Al realizar la comparación entre las medianas de los períodos de reperfusión seguidos de isquemia de una hora, se encontraron diferencias significativas, valor $p = 0.027$.

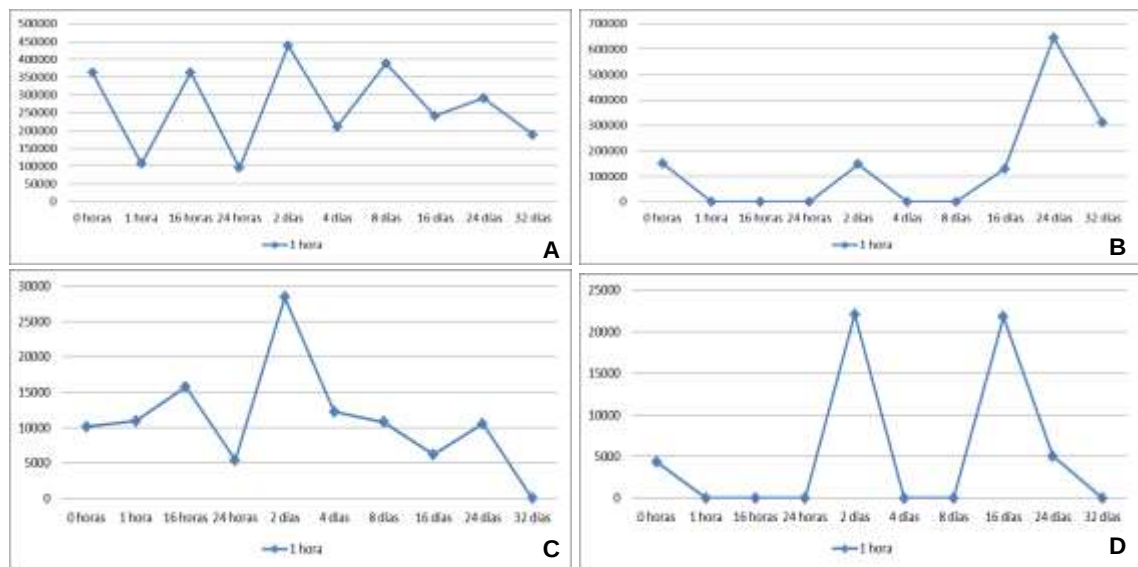


Figura 38. Comparación de las medianas en el área de las fibras glucolíticas entre los períodos de reperfusión que siguieron a una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial longo del carpo en aumento 10x. Se observa fluctuaciones en los diferentes períodos de reperfusión. La distribución de las medianas no sigue un patrón lineal. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. Se da una tendencia al aumento en el área de fibras glucolíticas, notorio en los períodos prolongados de reperfusión. **C.** Músculo extensor radial longo del carpo en 40x. Es evidente una menor área de fibras glucolíticas a los 32 días de reperfusión. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Se observa cambios hacia fibras glucolíticas a los dos días y 16 días de reperfusión, que tienden a disminuir en los períodos prolongados.

9.7.3.1.2.2. En tres horas de isquemia

Para el músculo extensor radial longo del carpo en aumento 10x, todas las áreas son inferiores al valor normal. La comparación de los grupos de reperfusión entre sí evidenció que las diferencias no fueron significativas.

En aumento 40x, únicamente la reperfusión de cero horas superó el valor en el músculo control, aunque se encuentra bastante cerca de este. En los demás grupos, las áreas fueron inferiores a la normal. La comparación entre los períodos de reperfusión seguidos de tres horas de isquemia se encontró diferencias significativas en la distribución de las medianas, valor $p < 0.05$.

En el músculo sóleo en aumento 10x, hubo presencia de fibras glucolíticas en

reperfusión de 16 horas, dos días, cuatro días, 16 días, 24 días y 32 días. La comparación entre sí de los períodos de reperfusión evidenció diferencias significativas, valor p 0.05.

En aumento 40x, los períodos de cuatro días, 16 días, 24 días y 32 días mostraron fibras glucolíticas en el campo microscópico. Al realizar la comparación entre las medianas de los periodos de reperfusión, se encontró que las diferencias fueron significativas, valor p 0.048.

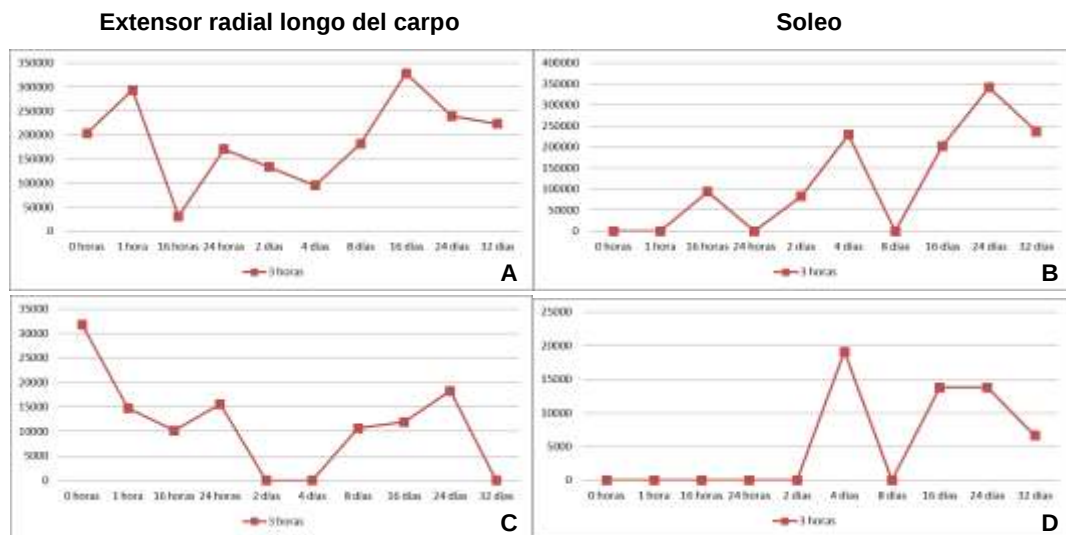


Figura 39. Comparación de las medianas en el área de las fibras glucolíticas entre los períodos de reperfusión que siguieron a tres horas de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Se observa diferencias entre 16 horas de reperfusión y 16 días. A los 32 días el área tiende a disminuir. **B.** Músculo sóleo en aumento 10X. El aumento en el área de fibras glucolíticas, se observa a los cuatro días y 24 días de reperfusión. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en 40x. La tendencia es hacia la disminución del área de fibras glucolíticas, evidente a los 32 días de reperfusión. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Nótese el incremento a los cuatro días y la disminución a los ocho días con un nuevo aumento en los períodos más prolongados.

9.7.3.1.2.3. Comparación entre una hora y tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en los aumentos 10x y 40x, no presentaron diferencias significativas entre las medianas de isquemia de una y tres horas seguido de reperfusión, valor $p > 0.05$.

Así mismo, en el músculo sóleo en aumento 10x y 40x, no se observaron diferencias significativas entre las medianas de los tiempos de reperfusión después de una y tres horas de isquemia, valor $p > 0.05$.

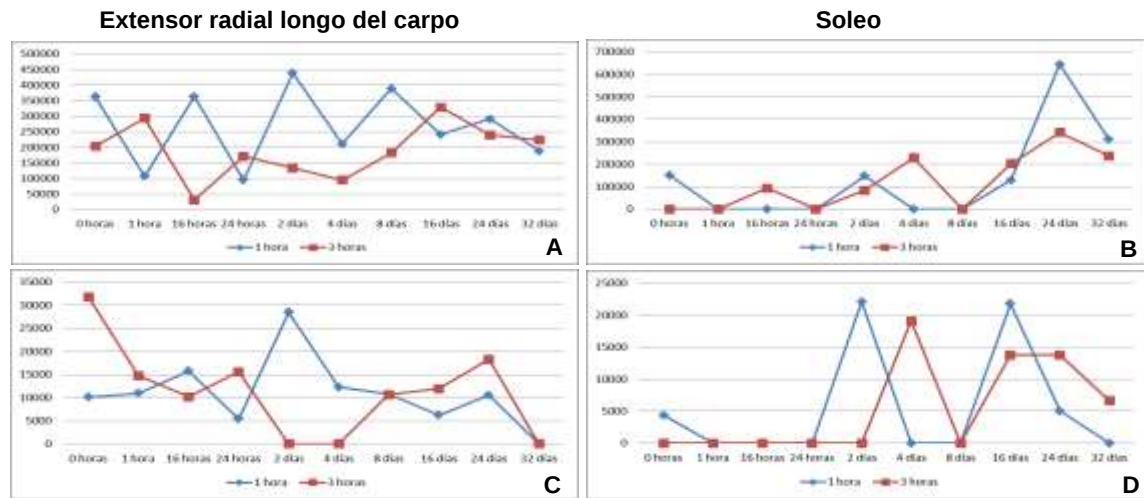


Figura 40. Comparación de las medianas en el área que ocupan las fibras musculares glucolíticas en tinción NADH-TR. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Extensor radial largo del carpo en 10x; se da una diferencia a las 16 horas y dos días de reperfusión. La tendencia en ambas curvas se encuentra en áreas similares, cercanas entre sí en el período de reperfusión más prolongado. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. La diferencia se encuentra en una hora de isquemia y 24 días de reperfusión; a los 32 días las áreas son similares, un poco más alto en una hora de isquemia. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en 40x. El comportamiento de ambas gráficas es similar, por lo que las diferencias entre ambas no son significativas. La evidencia de áreas con valor cero, está relacionada con lo identificado en el campo microscópico, razón por la que difiere de lo observado en 10x para el mismo músculo. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. El campo microscópico evidencia periodos en los que las fibras glucolíticas tienden a aumentar en área, de ahí las diferencias entre períodos a los dos, cuatro y 16 días de reperfusión.

<i>Extensor radial largo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	Reperusión	1 h	3 h	Diferencia
Control	520662	520662	0	Control	0	0	0
0 horas	362328,5	203932,35	-158396,15	0 horas	151071,25	0	151071,25
1 hora	106968	293711,7	186743,7	1 hora	0	0	0
16 horas	362844	31092,905	-331751,095	16 horas	0	93474	-93474
24 horas	95123,835	170819	75695,165	24 horas	0	0	0
2 días	438089,65	133868,95	-304220,7	2 días	147410,55	83625,5	63785,05
4 días	210550,35	95235	-115315,35	4 días	0	229051,75	-229051,75
8 días	388956,35	181929,9	-207026,45	8 días	0	0	0
16 días	241541,6	328475,6	86934	16 días	129863,1	202130,85	-72267,75
24 días	290937,9	239384,3	-51553,6	24 días	644614,75	341404,3	303210,45
32 días	187917	223169	35252	32 días	310010,7	237209,69	72801,005

Tabla 20. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras glucolíticas, tinción NADH-TR en ambos músculos en aumento 10x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

<i>Extensor radial largo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	Reperusión	1h	3h	Diferencia
Control	30552	30552	0	Control	0	0	0
0 horas	10121,6	31790,68	21669,08	0 horas	4345,08	0	4345,08
1 hora	10916,75	14726,15	3809,4	1 hora	0	0	0
16 horas	15769,065	10164,715	-5604,35	16 horas	0	0	0
24 horas	5382	15593,03	10211,03	24 horas	0	0	0
2 días	28443,775	0	-28443,775	2 días	22101	0	22101
4 días	12256,57	0	-12256,57	4 días	0	19080,57	-19080,57
8 días	10757,69	10649,135	-108,555	8 días	0	0	0
16 días	6207,9	11932,8885	5724,9885	16 días	21790,905	13756,89	8034,015
24 días	10532,525	18268,18	7735,655	24 días	5035,81	13793,215	-8757,405
32 días	0	0	0	32 días	0	6647,76	-6647,76

Tabla 21. Medición de las medianas y sus diferencias en el área en micras que ocupan las fibras glucolíticas, tinción NADH-TR en ambos músculos en aumento 40x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

9.7.3.1.3. Fibras intermedias

9.7.3.1.3.1. En una hora de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, se observó aumento en el área en relación con el músculo control, excepto a las 24 horas y 16 días de reperfusión. La comparación entre los grupos de reperfusión mostró que las diferencias son significativas, valor p 0.031.

En aumento 40x, las medianas tienden a ser superiores al control excepto a las 24 horas. Al comparar las medianas de los períodos de reperfusión, se encuentran diferencias significativas, valor p 0.036.

En el músculo sóleo en aumento 10x, los grupos que superan el valor normal son dos días, cuatro días, 16 días y 32 días. Los demás son inferiores al del grupo control. En la comparación de todos los períodos de reperfusión hubo diferencias significativas, valor p 0.029.

En aumento 40x, los valores que superan el normal son los correspondientes a dos días, 24 días y 32 días; los demás valores son inferiores al mismo. Al realizar la comparación entre las medianas de los periodos de reperfusión se encontraron diferencias significativas, valor p 0.029.

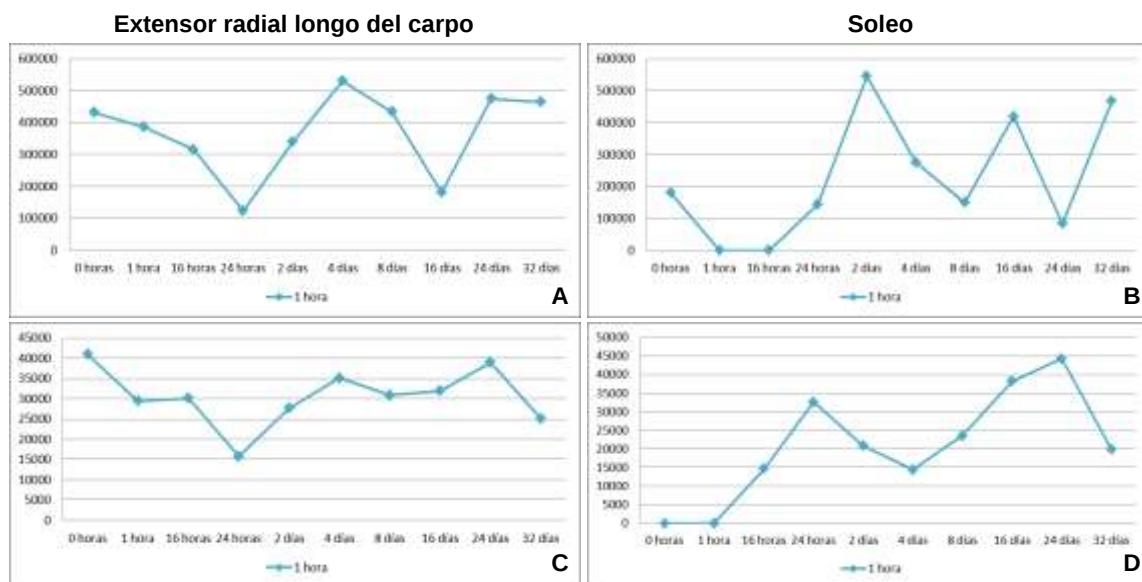


Figura 41. Comparación de las medianas en el área de las fibras intermedias entre los períodos de perfusión que siguieron a una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Se observa diferencias a las 24 horas y 16 días de perfusión donde tiende a disminuir. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. El aumento en el área se evidencia a los dos días, 16 días y 32 días de perfusión. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en 40x. La gráfica no presenta variaciones evidentes entre los períodos de perfusión. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Se observa incrementos graduales en los períodos prolongados de perfusión y luego una tendencia a la disminución en el día 32.

9.7.3.1.3.2. En tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, las áreas superiores al control, se encuentran desde las 24 horas hasta los 32 días de perfusión. Los grupos de cero horas, una hora y 16 horas, presentan valores inferiores al normal. La comparación de los períodos de perfusión entre sí, no evidenció diferencias significativas, valor $p > 0.05$.

En aumento 40x, las medianas tienden a ser inferiores al control en cero horas, 16 horas, dos días y 16 días. En los demás grupos es superior. Al compararlas entre sí para todos los períodos de perfusión, se encuentra que las diferencias son significativas, valor $p = 0.039$.

En el músculo sóleo en aumento 10x, las medianas son inferiores en cero horas, y ocho días, mientras que en el resto de períodos son superiores al control. La

comparación entre los períodos de reperfusión evidenció que las diferencias son significativas, valor p 0.037.

En aumento 40x, las medianas inferiores al grupo control se encuentran a las cero horas, una hora y ocho días. En los demás grupos de reperfusión son superiores al valor normal. Al realizar la comparación entre las medianas de los períodos de reperfusión seguidos de isquemia de tres horas, se encontraron diferencias en las fibras intermedias valor p 0.036.

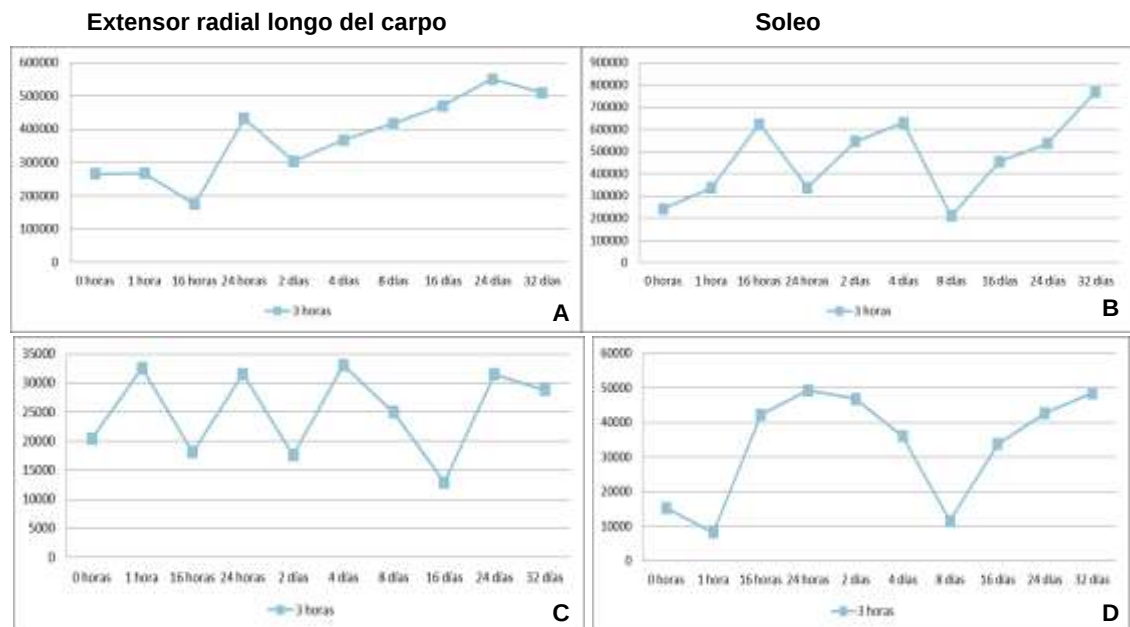


Figura 42. Comparación de las medianas en el área de las fibras intermedias entre los períodos de reperfusión que siguieron a tres horas de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Se observa diferencias a las 24 horas y dos días de reperfusión A los 32 días, el valor es superior. **B.** Músculo sóleo en aumento 10X. Se observa aumento en el área en los períodos prolongados de reperfusión. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en 40x. Se observa cambios de aumento y disminución que fluctúan entre los períodos. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Se observa incrementos en los períodos cortos, con disminución en los intermedios y nuevamente aumento en los períodos de reperfusión prolongados.

9.7.3.1.3.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia

Para las fibras intermedias, en el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x y 40x, no presentaron diferencias significativas entre las medianas de isquemia de una y tres horas seguido de perfusión, valor $p > 0.05$.

En el músculo sóleo en aumento 10x, la distribución de fibras intermedias si evidenció diferencias significativas entre una y tres horas de isquemia, valor $p = 0.000$. Las diferencias se ubicaron en isquemia de una hora con perfusión de dos días, cuatro días, ocho días y 32 días, con todos los periodos de perfusión seguidos a tres horas de isquemia.

En aumento 40x, en las fibras de contracción intermedia las diferencias entre una y tres horas de isquemia son significativas, valor $p = 0.008$. Estas se dieron en isquemia de una con perfusión de una hora, 16 horas y ocho días, con todos los periodos de perfusión seguidos a tres horas de isquemia

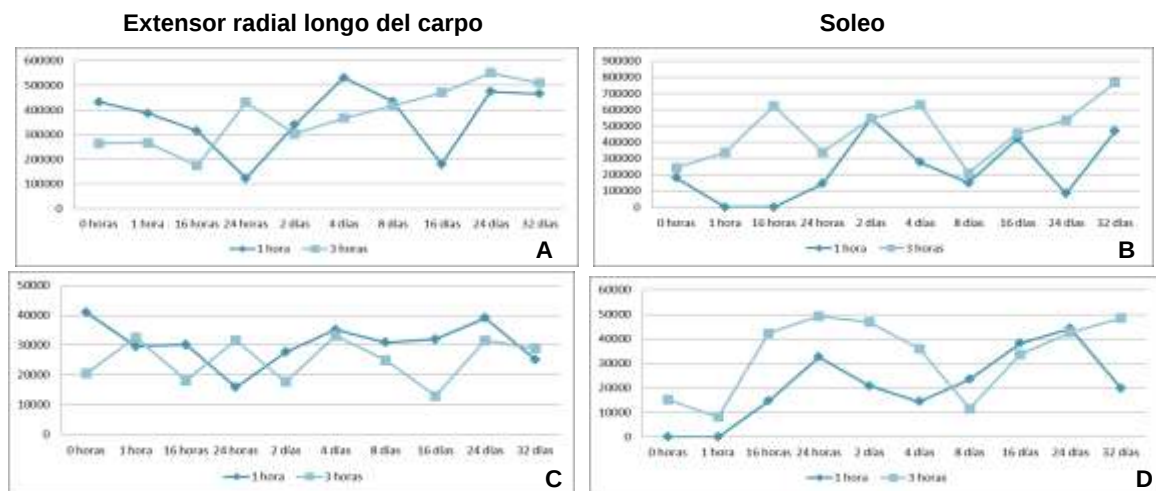


Figura 43. Comparación de las medianas en el área que ocupan las fibras musculares intermedias en ambos músculos. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. La tendencia en los periodos cortos de perfusión es similar. Se presentan algunos cambios en los periodos de 24 horas, cuatro y 16 días de perfusión. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. Son mayores las áreas en isquemia de tres horas; se observa diferencias en los periodos iniciales hasta 24 horas, tanto en una hora como en tres horas de isquemia. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. La diferencia más notoria se observan a los 16 días de perfusión al comparar las áreas en una y tres horas de isquemia. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Se presenta cambios en tres horas de isquemia y en 16 horas, 24 horas, dos días y cuatro días de perfusión.

<i>Extensor radial longo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1h	3h	Diferencia	Reperusión	1h	3h	Diferencia
Control	293499	293499	0	Control	247338	247338	0
0 horas	431893,5	264848,35	167045,15	0 horas	180803,95	241782,2	-60978,25
1 hora	386332,8	267107,4	119225,4	1 hora	0	335930,5	-335930,5
16 horas	316036,5	174740,05	141296,45	16 horas	0	622492,5	-622492,5
24 horas	123290,45	431658,15	-308367,7	24 horas	144561,4	337377	-192815,6
2 días	339198,3	303618,1	35580,2	2 días	545498,3	543982,75	1515,55
4 días	530788,55	367105,8	163682,75	4 días	276075,55	628718,1	-352642,55
8 días	434386,1	416147,9	18238,2	8 días	149835	210082,75	-60247,75
16 días	180427	470182,85	-289755,85	16 días	419147,8	453476,2	-34328,4
24 días	474972,15	549958	-74985,85	24 días	83892,57	534923,15	-451030,58
32 días	465125	508839,95	-43714,95	32 días	467703,7	766984,65	-299280,95

Tabla 22. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras intermedias, tinción NADH-TR en ambos músculos en aumento 10x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

<i>Extensor radial longo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1h	3h	Diferencia	Reperusión	1h	3h	Diferencia
Control	20987	20987	0	Control	26905	26905	0
0 horas	40954,45	20366,47	20587,98	0 horas	10818,6	15262,11	-4443,515
1 hora	29503,65	32550,175	-3046,52	1 hora	0	8110	-8110
16 horas	30103,53	18080,22	12023,315	16 horas	0	42287,49	-42287,49
24 horas	15803	31510,46	-15707,46	24 horas	14693,17	49211,28	-34518,10
2 días	27643,24	17597,42	10045,825	2 días	32645	46796,15	-14151,15
4 días	35174,33	33093,13	2081,2	4 días	20842,58	35980,2	-15137,61
8 días	30866,80	24960,605	5906,2	8 días	14436,58	11544,34	2892,24
16 días	31974,43	12881,237	19093,193	16 días	23529,21	33671,68	-10142,47
24 días	39022,46	31493,335	7529,125	24 días	38229,92	42655,03	-4425,115
32 días	25156,49	28793,525	-3637,035	32 días	44 303,87	48454,21	-4150,34

Tabla 23. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras intermedias, tinción NADH-TR en ambos músculos en aumento 40x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

9.7.3.2. Tinción miosina adenosin trifosfatasa a preincubación ácida 4.6. (mATPasa pH 4.6)

9.7.3.2.1. Fibras de contracción lenta

9.7.3.2.1.1. En una hora de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, son inferiores las áreas en relación con el grupo control en cero horas, 16 horas, 24 horas, dos días, cuatro días y ocho días. En los demás grupos son superiores al valor normal. Al comparar entre sí los periodos de reperfusión se encuentran que las diferencias son significativas, valor p 0.034.

En aumento 40x, las medianas de las áreas son mayores al valor normal, excepto en 24 horas, dos días, cuatro días y 16 días. La comparación entre los periodos de reperfusión, muestra que los cambios son significativos, valor p de 0.026.

En el músculo sóleo en aumento 10x, se observa incremento en el área correspondiente en relación con el control, excepto en 16 días. Al comparar entre sí los periodos de reperfusión, se encuentra que las diferencias son significativas, valor p 0.028.

En aumento 40x, también se observa aumento en el área en relación con el control, excepto a los 16 días. Al comparar entre periodos de reperfusión, se encuentra que los cambios son significativos, valor p de 0.032.

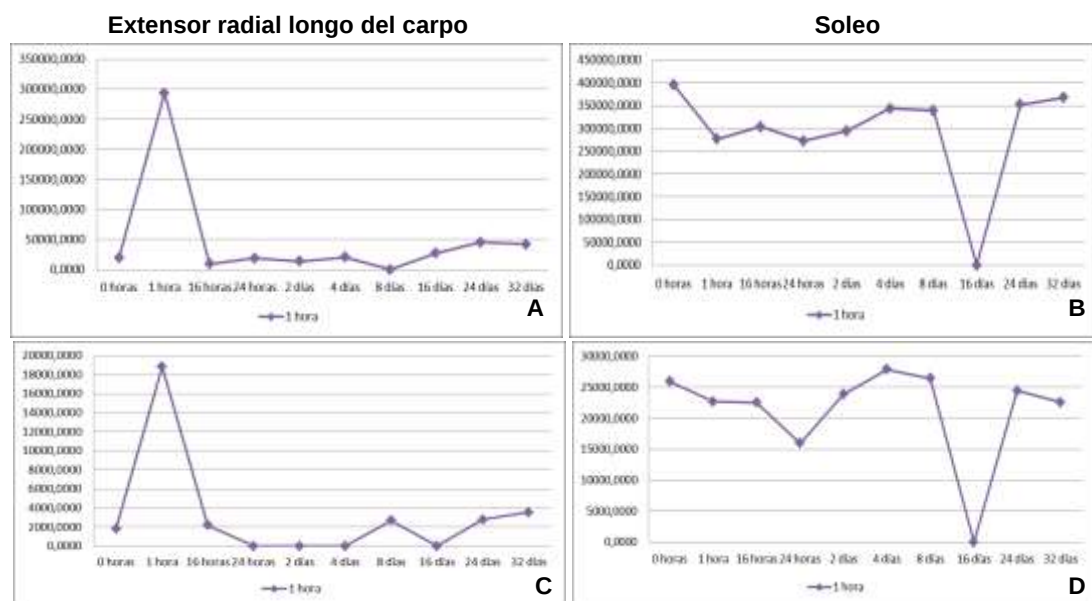


Figura 44. Comparación de las medianas en el área de las fibras de contracción lenta entre los períodos de reperfusión que siguieron a una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial longo del carpo en aumento 10x. Durante la reperfusión se observa un área pequeña excepto en reperfusión de una hora. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. Llama la atención la disminución drástica a los 16 días de reperfusión. Las demás áreas se conservan en rangos similares. **C.** Músculo extensor radial longo del carpo en aumento 40x. Presenta igual tendencia a lo observado en 10x. Evidencia un aumento leve en los periodos prolongados de 24 y 32 días. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Demuestra la misma tendencia observada en aumento 10x. Se identifica una disminución a las 24 horas de reperfusión.

9.7.3.2.1.2. En tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial longo del carpo en aumento 10x, las áreas en su mayoría son superiores al control, excepto en 24 horas, 16 días y 32 días. La comparación entre los períodos de reperfusión indicó que las diferencias no son significativas, valor $p > 0.05$.

En aumento 40x, las áreas también presentan un aumento en relación con el valor normal, exceptuando 24 horas y 24 días. La distribución en los períodos de reperfusión no evidenció diferencias significativas, valor $p > 0.05$.

En el músculo sóleo en aumento 10x y 40x, se evidenció aumento en las áreas en relación al control, excepto en ocho días. La comparación entre períodos de

reperfusión, no arrojó diferencias significativas en la distribución de las fibras de contracción lenta, valor $p > 0.05$.

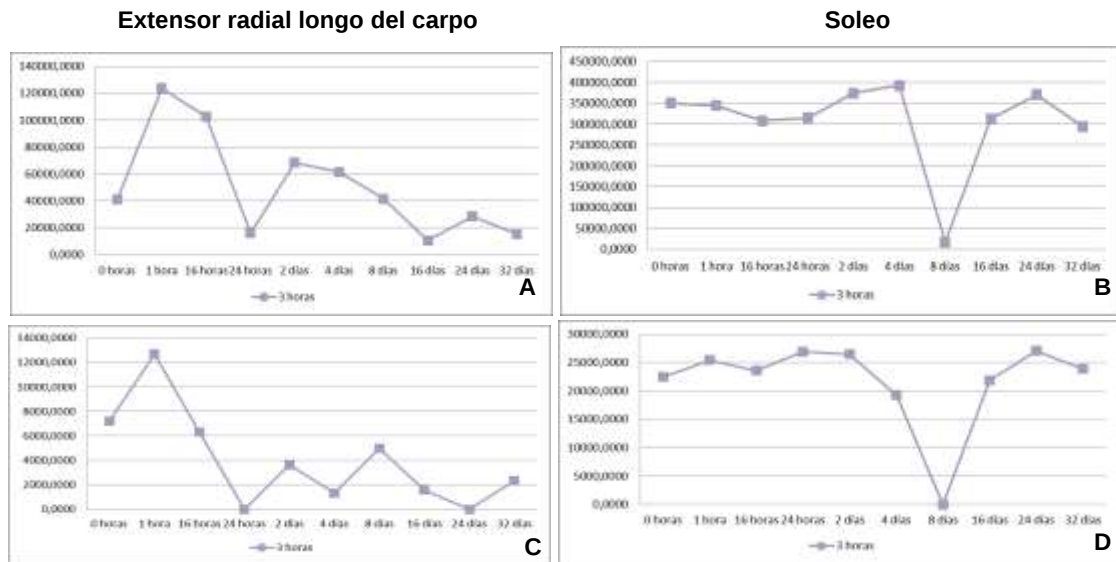


Figura 45. Comparación de las medianas en el área de las fibras de contracción lenta entre los períodos de reperfusión que siguieron a tres horas de isquemia Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Durante la reperfusión se observa una tendencia a la disminución en el área. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. En este caso la disminución drástica se presenta a los ocho días de reperfusión. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. Presenta tendencia a la disminución con aumentos que no superan el área observada a la hora de reperfusión. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Demuestra el mismo patrón observado en aumento 10x.

9.7.3.2.1.2. Comparación entre una hora y tres horas de isquemia

La distribución de fibras de contracción lenta para el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x y 40x, no presenta diferencias significativas entre los periodos de reperfusión seguidos de una y tres horas de isquemia, valor $p > 0.05$.

De la misma manera, en el músculo sóleo en aumento 10x y 40x, la distribución de fibras de contracción lenta entre una y tres horas de isquemia seguida de reperfusión, no presenta diferencias significativas, valor $p > 0.05$.

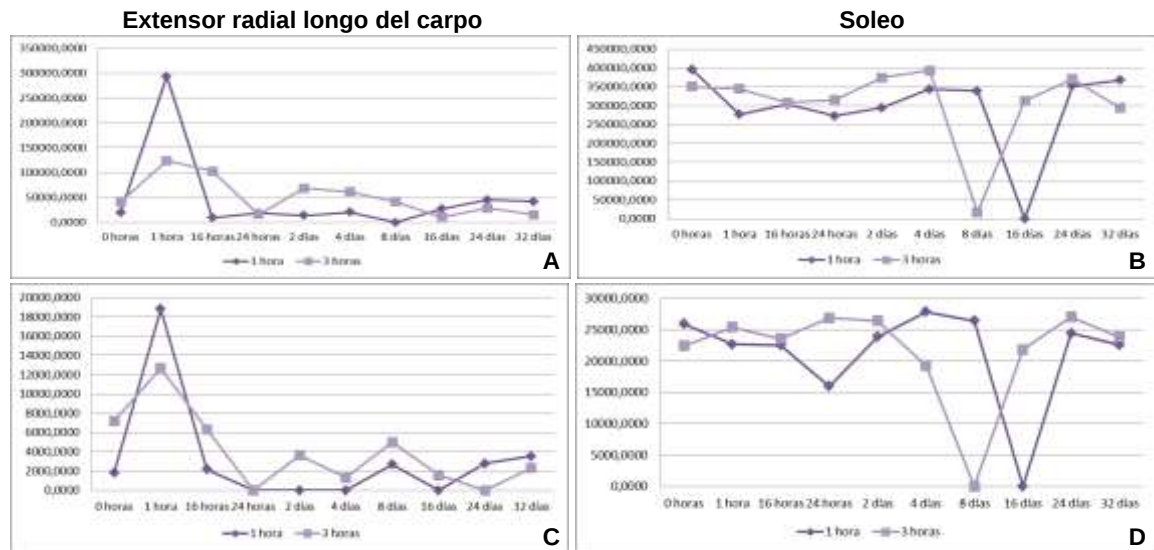


Figura 46. Comparación de las medianas en el área que ocupan las fibras de contracción lenta, medidas en tinción mATPasa pH 4.6. **A.** Músculo extensor radial longo del carpo en aumento 10x. Las áreas en una hora y tres horas tienden a ser similares, excepto en una hora de reperfusión en el que se observa un valor más alto. Las diferencias entre períodos se encuentran entre los cortos y los prolongados. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. El comportamiento en las gráficas es parecido. Las diferencias entre periodos se dan a los 8 días para isquemia de tres horas y 16 días de reperfusión para isquemia de una hora. Entre los períodos cortos y prolongados las diferencias son pequeñas. **C.** Músculo extensor radial longo del carpo en aumento 40x. La diferencia permanece en reperfusión de una hora seguido a isquemia de una hora al igual que las diferencias entre períodos cortos y prolongados de reperfusión. **D.** Músculo soleo en aumento 40x. Se dan iguales cambios a los descritos en aumento 10x.

<i>Extensor radial largo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	Reperusión	1 h	3 h	Diferencia
Control	26283	26283	0	Control	114835	114835	0
0 horas	19554,50	40928,73	21374,23	0 horas	395606,85	350747,00	44859,85
1 hora	293542,50	123853,50	-169689,00	1 hora	276348,85	344598,00	-68249,15
16 horas	9476,00	102719,13	93243,13	16 horas	303162,00	308377,30	-5215,30
24 horas	18809,37	16007,90	-2801,47	24 horas	272332,50	315294,77	-42962,27
2 días	13625,42	68303,10	54677,68	2 días	294596,20	374141,00	-79544,80
4 días	20300,00	61558,89	41258,89	4 días	343478,05	393179,55	-49701,50
8 días	0,00	41542,48	41542,48	8 días	338653,55	17196,50	321457,05
16 días	27206,93	10551,96	-16654,97	16 días	0,00	312815,85	-312815,85
24 días	45011,66	28425,89	-16585,77	24 días	351826,95	370834,95	-19008,00
32 días	42093,73	15489,04	-26604,70	32 días	367200,90	294533,95	72666,95

Tabla 24. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras de contracción lenta, tinción mATPasa en ambos músculos en aumento 10x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

<i>Extensor radial largo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	Reperusión	1 h	3 h	Diferencia
Control	1051	1051	0	Control	9076	9076	0
0 horas	1818,95	7194,61	5375,66	0 horas	25938,50	22450,68	3487,82
1 hora	18816,10	12692,30	-6123,81	1 hora	22704,65	25401,00	-2696,36
16 horas	2175,48	6324,79	4149,31	16 horas	22559,93	23586,68	-1026,75
24 horas	0,00	0,00	0,00	24 horas	15980,08	26905,36	-10925,28
2 días	0,00	3616,64	3616,64	2 días	23855,16	26452,42	-2597,26
4 días	0,00	1316,19	1316,19	4 días	27878,83	19254,91	8623,92
8 días	2665,16	4983,80	2318,64	8 días	26431,83	0,00	26431,83
16 días	0,00	1576,63	1576,63	16 días	0,00	21885,56	-21885,56
24 días	2784,49	0,00	-2784,49	24 días	24450,76	27049,50	-2598,75
32 días	3524,68	2312,08	-1212,60	32 días	22579,50	23877,62	-1298,12

Tabla 25. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras de contracción lenta, tinción mATPasa en ambos músculos en aumento 40x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

9.7.3.2.2. Fibras de contracción rápida

9.7.3.2.2.1. En una hora de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, en su mayoría las áreas son inferiores a la del grupo control, a excepción de cero horas, 16 horas y ocho días. Al comparar los períodos de reperfusión entre sí, se encontró que hay significancia en las diferencias, valor p 0.027.

En aumento 40x, por el contrario, los valores en las áreas son mayores al normal, con excepción de una hora de reperfusión. Al comparar entre periodos de reperfusión, se encuentra que, los cambios son significativos, valor p 0.047.

En el músculo sóleo en aumento 10x, las áreas correspondientes a 16 horas, dos días y 32 días superan el valor normal. Al comparar entre sí los períodos de reperfusión, se encuentran diferencias significativas, valor p 0.026.

En aumento 40x, los períodos de cero horas, 16 horas, dos días, 16 días y 32 días presentan aumento en su área en relación con el control. Al comparar los periodos de reperfusión, se encuentra que las diferencias son significativas, valor p 0.028.

Extensor radial largo del carpo

Soleo

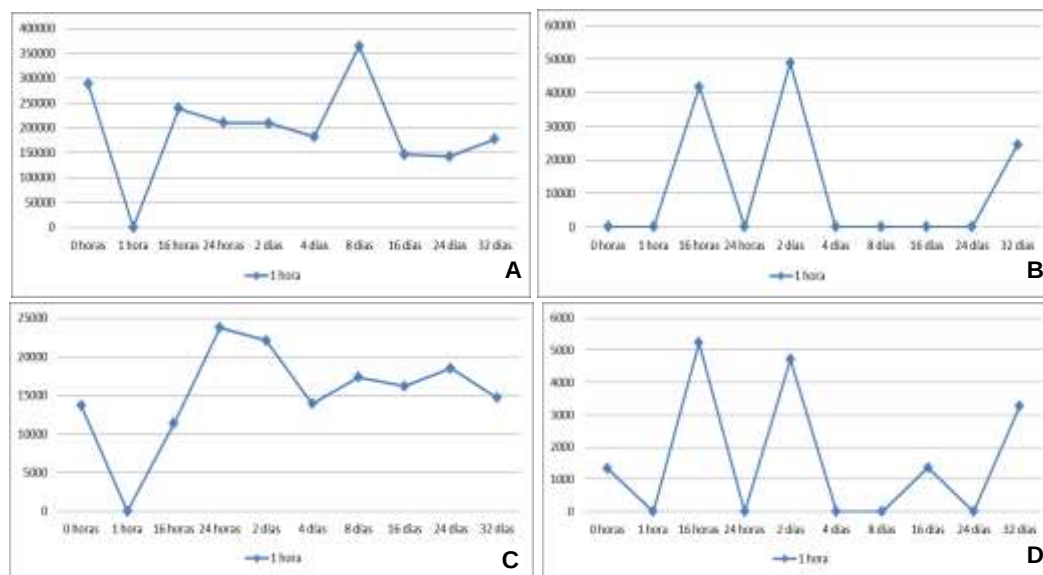


Figura 47. Comparación de las medianas en el área de las fibras de contracción rápida entre los períodos de reperfusión que siguieron a una hora de isquemia Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Durante la reperfusión se observa diferencias entre una hora y ocho días de reperfusión. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. Solo en tres de los grupos de reperfusión se observa presencia de fibras glucolíticas en el campo microscópico. Nótese que aún en 32 días se identifica este tipo de cambios. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. Presenta tendencia al aumento en 16 horas y 24 horas para luego finalizar con un área similar a la de cero horas de reperfusión. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Demuestra el mismo patrón observado en aumento 10x.

9.7.3.2.2.2. En tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, todas las medianas se encuentran disminuidas en relación al control excepto en 16 días. Las diferencias entre los grupos de reperfusión no son significativas, valor $p > 0.05$.

En aumento 40x, presentan un aumento en relación con el valor normal en 24 horas, dos días, 16 días y 32 días. Los demás grupos evidencian medianas inferiores a la normal. La distribución en los periodos de reperfusión no evidenció diferencias significativas, valor $p > 0.05$.

En el músculo sóleo en aumento 10x, se encuentran aumento en el área a las cero horas, 16 horas y dos días. En la comparación entre períodos de reperfusión,

no se evidencian diferencias significativas en la distribución de las fibras glucolíticas, valor $p > 0.05$.

En aumento 40x, en isquemia de tres horas, el aumento se observa en cero horas y 16 horas. No se presentan diferencias significativas, valor $p > 0.05$.

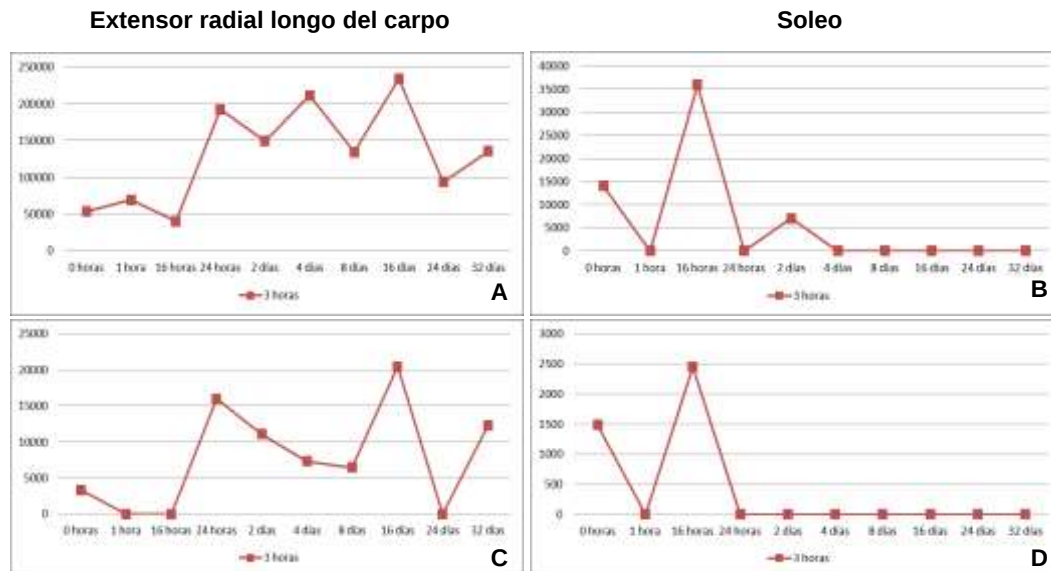


Figura 48. Comparación de las medianas en el área de las fibras de contracción rápida entre los períodos de reperfusión que siguieron a tres horas de isquemia Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Durante la reperfusión se observa diferencias entre 16 horas, cuatro días y 16 días. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. Solo en tres de los grupos de reperfusión se observa presencia de fibras glucolíticas en el campo microscópico. El pico se encuentra a las 24 horas. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. Presenta tendencia al aumento incluso en el día 32 de reperfusión. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Demuestra el mismo patrón observado en aumento 10x.

9.7.3.2.2.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, las fibras de contracción rápida si presentan diferencias entre una y tres horas de isquemia, valor p 0.021; la diferencia se encuentra en isquemia de una hora con reperfusión de una hora en relación isquemia de tres horas y reperfusión de 24 horas, cuatro días y ocho días.

En aumento 40X, las diferencias entre isquemias de una y tres horas se encontraron en la distribución de las fibras de contracción rápida con un valor p 0.010; estas diferencias se dieron entre isquemia de una hora con reperfusión de una hora en relación con, isquemia de tres horas y reperfusión de 24 horas, dos días, ocho días, 16 días y 32 días e, isquemia de una hora con reperfusión de 16 horas, con isquemia de tres horas y reperfusión de 24 horas y 16 días.

En el músculo sóleo en aumento 10X, la distribución de fibras de contracción rápida entre una y tres horas de isquemia seguida de reperfusión, no presenta diferencias significativas, valor $p > 0.05$.

En aumento 40X, las diferencias entre isquemias de una y tres horas se observaron únicamente en las fibras de contracción rápida, valor p 0.021; las diferencias se ubicaron en isquemia de una hora y reperfusión de 16 horas con isquemia de tres horas y todos los periodos de reperfusión, excepto dos días; así mismo, en isquemia de una hora y reperfusión de dos días con isquemia de tres horas y reperfusión de una hora, 24 horas, cuatro días, ocho días y 24 días.

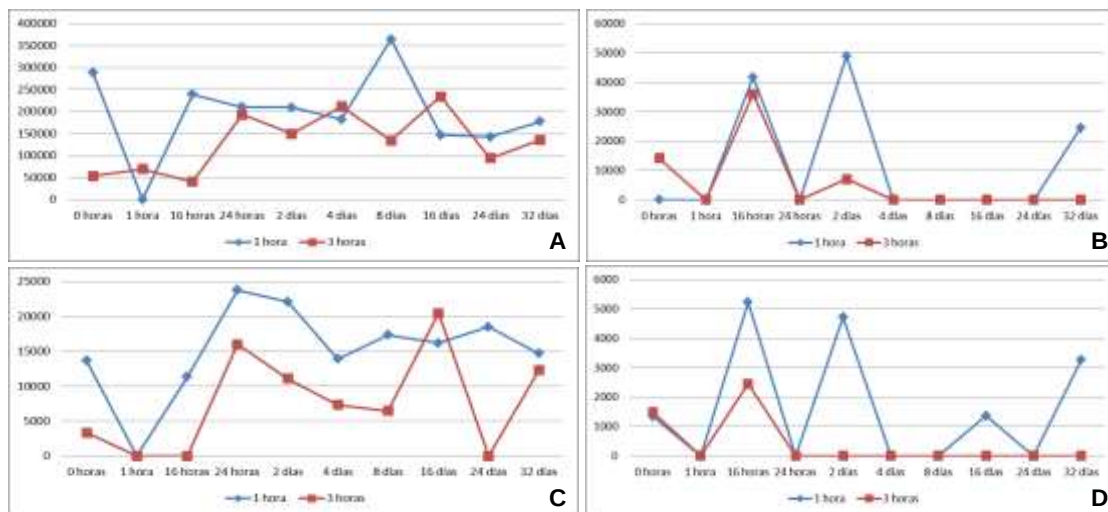


Figura 49. Comparación de las medianas en el área que ocupan las fibras de contracción rápida, medidas en tinción mATPase pH 4.6. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Se observa diferencia en una hora de ischemia con una hora de reperfusion y una hora de ischemia con ocho días de reperfusion. Las variaciones son similares en ambos periodos de ischemia. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. Se observa en reperfusion de dos días diferencia entre una y tres horas de ischemia, así como a los 32 días. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. El área que genera en este tipo de fibras que genera una hora de ischemia es mayor que en tres horas, con excepción de ischemia de tres horas con reperfusion de 16 días. **D.** Músculo soleo en aumento 40x. Se dan iguales cambios a los descritos en aumento 10x.

<i>Extensor radial largo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	Reperusión	1 h	3 h	Diferencia
Control	229265	229265	0	Control	0	0	0
0 horas	287943	53561,06	2343	0 horas	0	14068	14068
1 hora	0	69301	-69301	1 hora	0	0	0
16 horas	238812	40243,14	198568	16 horas	41687,2	35969,2	5718
24 horas	210042,5	192742,2	17300	24 horas	0	0	0
2 días	209172,65	149287,7	59884	2 días	48939,14	7032,4	41906,74
4 días	182171,2	211339,0	-29167	4 días	0	0	0
8 días	364304,75	134410,8	229893	8 días	0	0	0
16 días	146256,3	234076,5	-87820	16 días	0	0	0
24 días	142246,4	93914,08	48332	24 días	0	0	0
32 días	177449,6	135847,2	41602	32 días	24454,49	0	24454,49

Tabla 26. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras de contracción rápida, tinción mATPasa en ambos músculos en aumento 10x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

<i>Extensor radial largo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	Reperusión	1 h	3 h	Diferencia
Control	8125	8215	0	Control	0	0	0
0 horas	13650,45	3342,36	10308,09	0 horas	1342	1486,3295	144,32
1 hora	0	0	0	1 hora	0	0	0
16 horas	11325,845	0	11325,845	16 horas	5228,4715	2450,615	-2777,85
24 horas	23752,225	15986,265	7765,96	24 horas	0	0	0
2 días	22090,43	11065,92	11024,51	2 días	4712,7745	0	-4712,77
4 días	13904	7321,715	6582,285	4 días	0	0	0
8 días	17323,225	6470,16	10853,065	8 días	0	0	0
16 días	16153,575	20456,76	-4303,185	16 días	1362,88	0	-1362,88
24 días	18503,23	0	18503,23	24 días	0	0	0
32 días	14697,48	12281,68	2415,8	32 días	3265,82	0	-3265,82

Tabla 27. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras de contracción rápida, tinción mATPasa en ambos músculos en aumento 40x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

9.7.3.2.3. Fibras intermedias

9.7.3.2.3.1. En una hora de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, las medianas de cero horas, una hora, 24 horas, dos días cuatro días y ocho días, son inferiores o cercanas al valor normal; mientras que en los períodos prolongados de 16, 24 y 32 días de reperfusión son superiores. La comparación entre los períodos de reperfusión evidencia que las diferencias entre las medianas son significativas, valor p 0.027.

En aumento 40x, todas las medianas en isquemia de una hora son inferiores al control. Al compararlas entre sí, se encuentra que los cambios son significativos en las fibras de contracción intermedia, valor p 0.026.

En el músculo sóleo en aumento 10x, los valores son inferiores o se encuentran cercanos al valor normal, con excepción de 16 horas, 24 horas y 16 días, en los que son superiores al control, los cuales posteriormente decaen a cero. Al comparar entre sí los períodos de reperfusión, se encuentran diferencias significativas en la distribución de las fibras de contracción intermedia, valor p 0.027.

En aumento 40x, las medianas son inferiores al valor normal, excepto en reperfusión de 16 días. Al comparar los periodos de reperfusión, se encuentra que en isquemia de una hora, las diferencias son significativas, valor p 0.026.

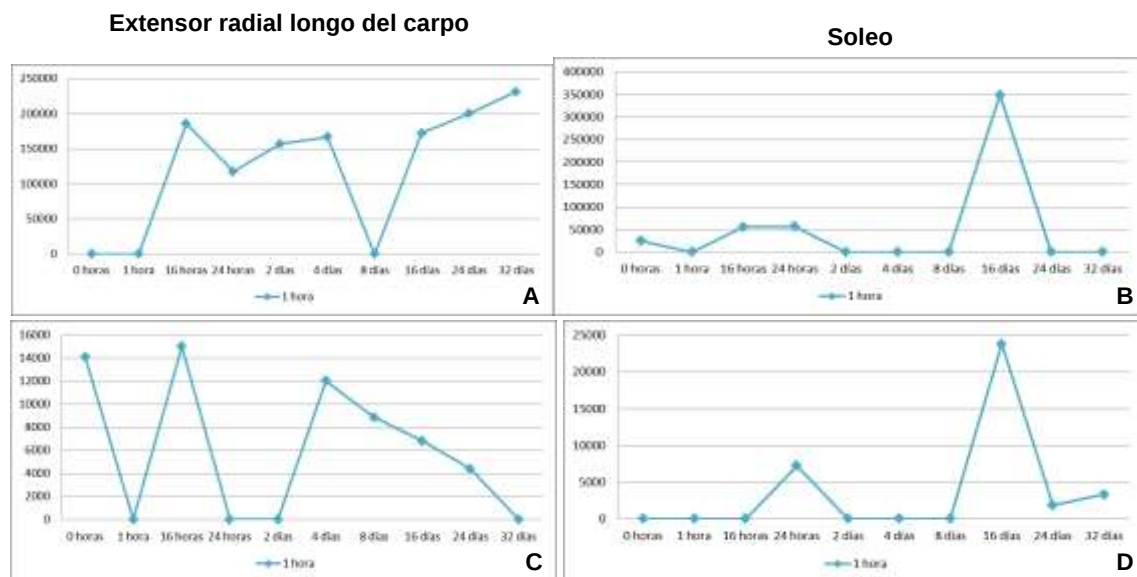


Figura 50. Comparación de las medianas en el área de las fibras de contracción intermedia entre los períodos de reperfusión que siguieron a una hora de isquemia Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Durante la reperfusión se observa diferencias a los ocho días y un aumento progresivo en los períodos de reperfusión prolongados. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. La diferencia observada se encuentra a los 16 días, período en el que se observa un aumento importante en el área correspondiente. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. La distribución de las medianas es diferente a la observada en 10x, la tendencia en este aumento es hacia la disminución. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Demuestra el mismo patrón observado en aumento 10x con un incremento leve en el área a los 32 días.

9.7.3.2.3.2. En tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, se observa que las áreas son inferiores al control, excepto en una hora, 24 días y 32 días, los cuales superan el valor normal. La comparación de los grupos de reperfusión no evidencia que las diferencias sean significativas, valor $p > 0.05$.

En aumento 40x, las áreas son también inferiores al control, con excepción de 24 días. Las medianas no presentaron diferencias significativas en su distribución, valor $p > 0.05$.

En el músculo sóleo en aumento 10x, las áreas son inferiores al control, exceptuando ocho días y 16 días. La comparación entre períodos de reperfusión seguidos a tres horas de isquemia, arroja diferencias significativas en la distribución de las fibras intermedias, valor p 0.035.

En aumento 40x, las áreas también son inferiores al control con excepción de ocho días. No se presentan diferencias significativas en la comparación de las medianas entre los periodos de reperfusión, valor $p > 0.05$.

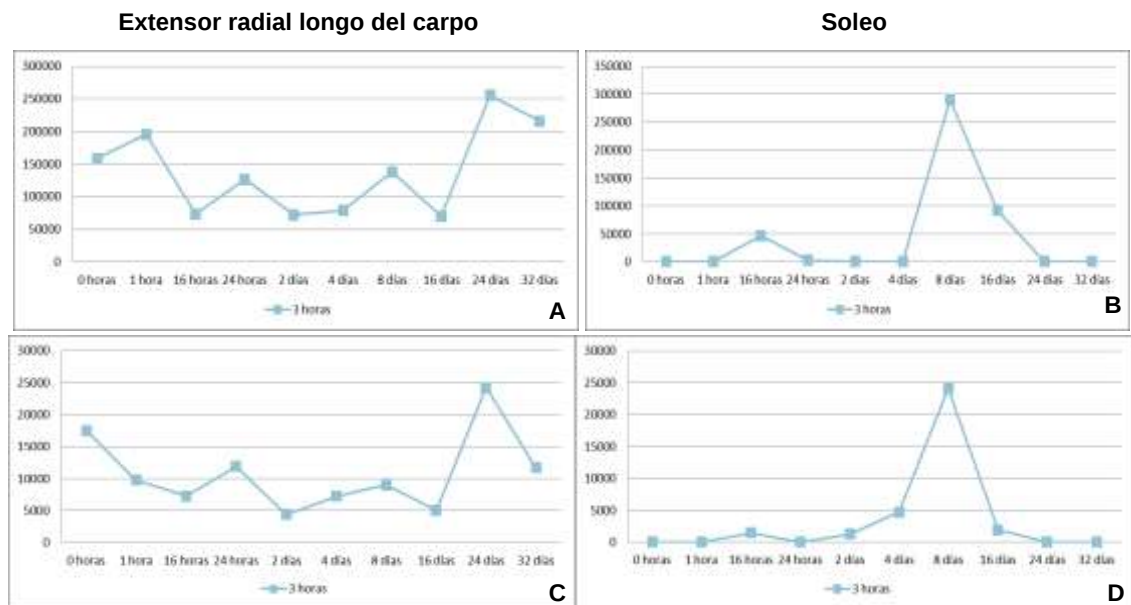


Figura 51. Comparación de las medianas en el área de las fibras de contracción intermedia entre los períodos de reperfusión que siguieron a tres horas de isquemia Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. Durante la reperfusión se observa diferencias en una hora, 24 días y 32 días. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. El valor más alto se encuentra a los ocho días de reperfusión. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. Presenta un aumento en el área a los 24 días. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. Demuestra el mismo patrón observado en aumento 10x.

9.7.3.2.3.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x, en las fibras de contracción intermedia no se observan diferencias significativas entre isquemia de una y tres horas.

En aumento 40x, hubo diferencias entre una y tres horas de isquemia en las fibras de contracción intermedia valor $p = 0.043$. Estas diferencias se ubicaron en una hora de isquemia sin reperfusión, con reperfusión de dos días y 24 días, con todos los periodos de reperfusión seguidos a tres horas de isquemia.

En el músculo sóleo en aumento 10x y 40x, la distribución de fibras de contracción intermedia entre una y tres horas de isquemia seguida de reperfusión, no presenta diferencias significativas, valor $p > 0.05$.

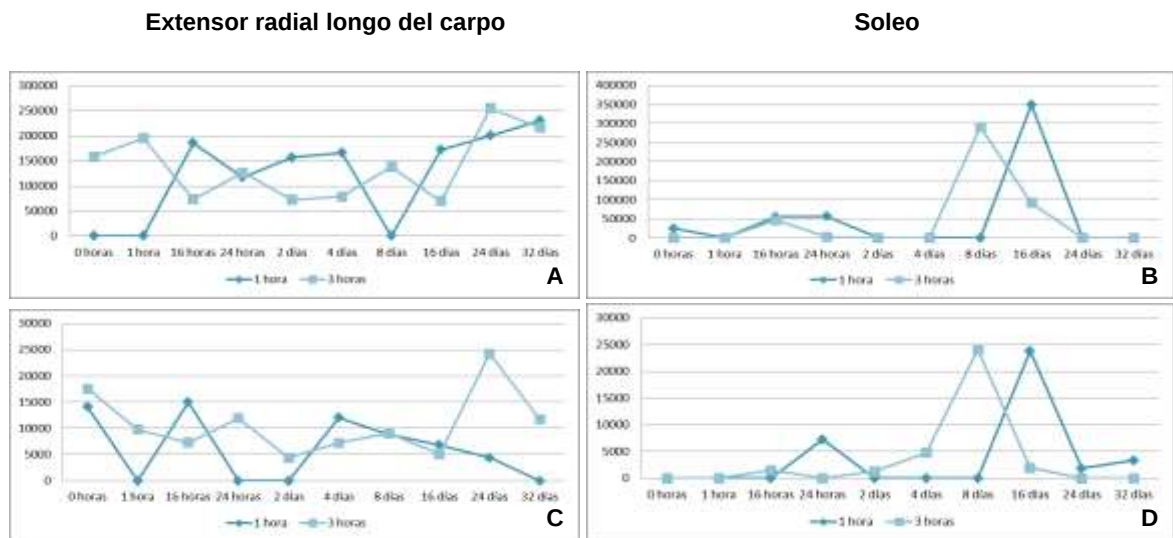


Figura 52. Comparación de las medianas en el área que ocupan las fibras musculares intermedias en tinción mATPasa. Eje X: Tiempo; Eje Y: Área. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 10x. La tendencia en ambas gráficas es similar con diferencia en los periodos de reperfusión iniciales y a los ocho días. **B.** Músculo sóleo en aumento 10x. La diferencia entre una y tres hora se encuentra entre ocho y 16 días de reperfusión. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo en aumento 40x. Se observa mucha variabilidad entre los periodos de reperfusión seguidos a una hora de isquemia. Se observa a los 24 días una diferencia amplia entre una y tres horas de isquemia. **D.** Músculo sóleo en aumento 40x. En general, la tendencia en las gráficas es muy similar a la observada en aumento 10x.

<i>Extensor radial longo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	Reperusión	1 hora	3 h	Diferencia
Control	171174	171174	0	Control	54871	54871	0
0 horas	0	158383,9	-158383,9	0 horas	24796,45	0	24796,45
1 hora	0	195225	-195225	1 hora	0	0	0
16 horas	186053	73249,66	112803,34	16 horas	55984,155	46910,345	9073,81
24 horas	117670,3	126523,9	-8853,6	24 horas	56739,48	2486,91	54252,57
2 días	157003,35	72308,25	84695,1	2 días	0	0	0
4 días	166459	79045,25	87413,75	4 días	0	0	0
8 días	0	138133,6	-138133,6	8 días	0	290199,8	-290199,8
16 días	172358,4	70144,335	102214,065	16 días	348965,6	92180,58	256785,02
24 días	200107,85	255548,65	-55440,8	24 días	0	0	0
32 días	230996,2	216070,65	14925,55	32 días	0	0	0

Tabla 28. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras intermedias, tinción mATPasa en ambos músculos en aumento 10x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

<i>Extensor radial longo del carpo (um)</i>				<i>Soleo (um)</i>			
eperusión	1 h	3 h	Diferencia	Reperusión	1 h	3 h	Diferencia
Control	17571	17571	0	Control	14481	14481	0
0 horas	14066,85	17534,59	-3467,74	0 horas	0	0	0
1 hora	0	9766,595	-9766,595	1 hora	0	0	0
16 horas	15001,98	7289,065	7712,915	16 horas	0	1489,11	-1489,11
24 horas	0	11897,965	-11897,965	24 horas	7234,19	0	7234,19
2 días	0	4391,88	-4391,88	2 días	0	1267,74	-1267,745
4 días	12012	7231,84	4780,16	4 días	0	4739,97	-4739,975
8 días	8861,125	9034,05	-172,925	8 días	0	24082,78	-24082,785
16 días	6806,08	5047,13	1758,95	16 días	23804,42	1953,65	21850,765
24 días	4389,91	24208,15	-19818,24	24 días	1859,435	0	1859,435
32 días	0	11706,53	-11706,53	32 días	3314,215	0	3314,215

Tabla 29. Medición de las medianas y sus diferencias del área en micras que ocupan las fibras intermedias, tinción mATPasa en ambos músculos en aumento 40x, correspondiente a una hora y tres horas de isquemia en relación con los diferentes períodos de reperusión.

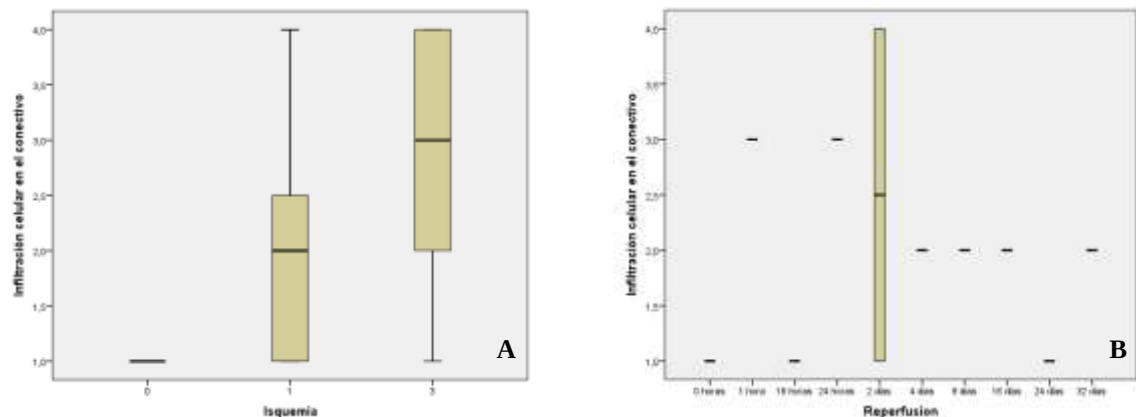
9.7.4. Cambios de lesión

Se analizaron los cambios relacionados con presencia de infiltración celular tanto en el tejido conectivo como en las fibras musculares de manera parcial y completa, la presencia de fibras circulares en lugar de hexagonales, localización central de los núcleos en lugar de periférica o ausencia de los mismos, evidencia de necrosis y regeneración celular, así como alteraciones en la organización del citoplasma. Todas estas variables se analizaron en imágenes en tinción hematoxilina-eosina en aumento 40X, excepto infiltración celular en el tejido conectivo en la que el aumento no fue relevante.

9.7.4.1. Infiltración celular en el tejido conectivo intramuscular

Se establecieron cuatro parámetros para esta variable cualitativa ordinal, ausente (1), leve o escasa (2), moderada (3) y abundante (4).

Para el músculo extensor radial largo del carpo, las diferencias entre el grupo control, isquemia de una hora seguido de reperfusión e isquemia de tres horas seguido de reperfusión, fueron significativas, valor p 0.02.



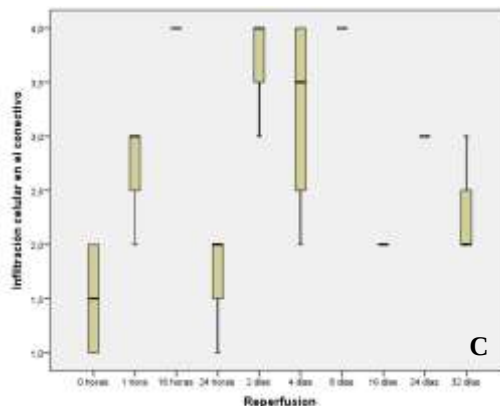
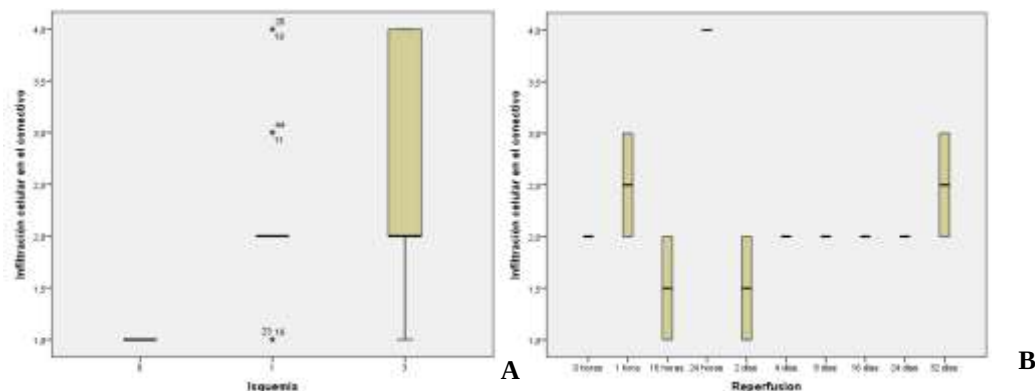


Figura 53. Musculo extensor radial largo del carpo. **A.** Comparación entre isquemia de una hora y tres horas en relación con el grupo control. **B.** Isquemia de una hora seguida de reperusión. **C.** Isquemia de tres horas seguida de reperusión.

Al comparar entre sí los grupos de reperusión para isquemia de una hora, las diferencias no son significativas, en su mayoría los datos se distribuyen entre ausente y moderado, valor p 0.094. Para isquemia de tres horas, las diferencias si son significativas, valor p 0.00.

Para el músculo sóleo las diferencias entre la reperusión seguida de isquemia de una y tres horas, no son significativas, valor p 0.402. Lo mismo ocurre al comparar los periodos de reperusión seguidos de una hora de isquemia, valor p 0.144. En contraste, la comparación de los valores de reperusión seguidos de tres horas de isquemia si presentan diferencias significativas entre sí, valor p 0.003.



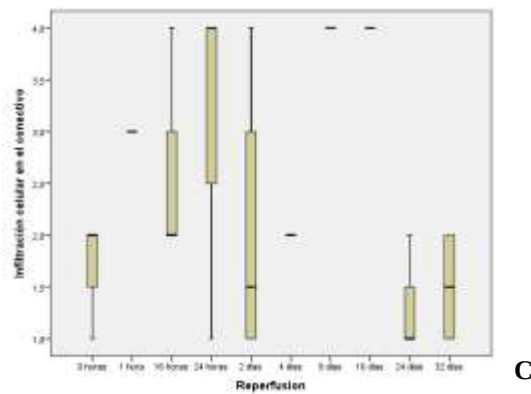


Figura 54. Musculo soleo. **A.** Comparación entre isquemia de una hora y tres horas en relación con el grupo control. **B.** Isquemia de una hora seguida de perfusión. **C.** Isquemia de tres horas seguida de perfusión.

9.7.4.2. Cambios en la forma de la célula

Para esta variable se realizó el conteo de las fibras con forma circular y se comparó con el número de fibras con forma hexagonal.

9.7.4.2.1. En una hora de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo, la comparación entre los periodos de perfusión, evidenció significancia en isquemia de una hora para ambas formas, valor p 0.025 cada una.

En el músculo sóleo, la comparación de los periodos de perfusión para isquemia de una hora evidenció diferencias significativas para las hexagonales únicamente, valor p 0.019, mientras que para las fibras circulares la significancia presentó un valor p de 0.071.

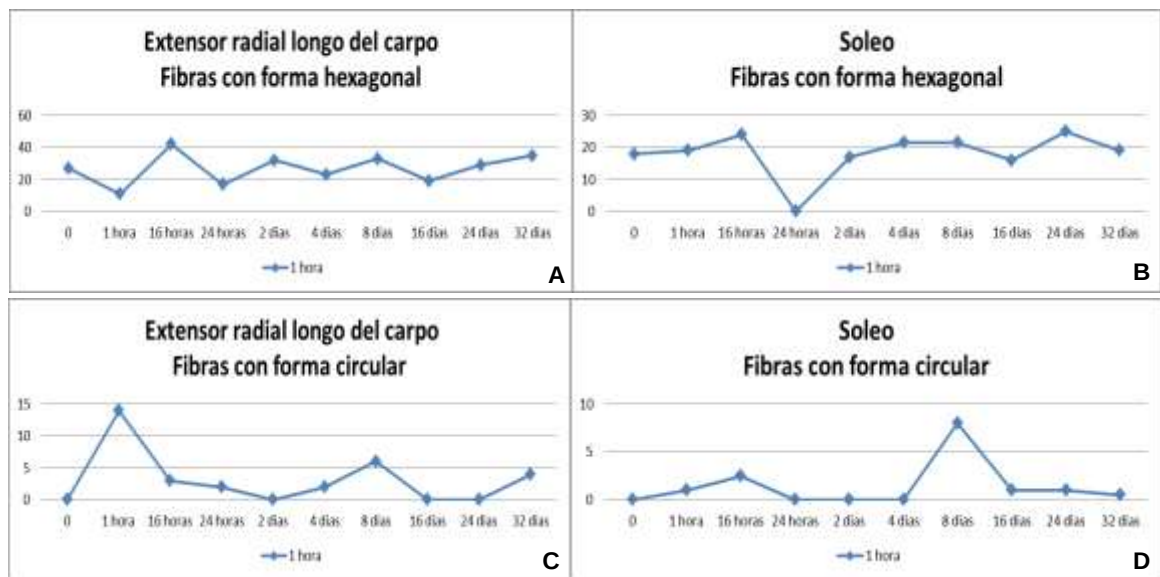


Figura 55. Comparación de las medianas en el conteo de fibras hexagonales y circulares entre los períodos de reperusión que siguieron a una hora de isquemia Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** Músculo extensor radial longo del carpo para fibras hexagonales. Se observa disminución en una hora, 24 horas y 16 días, con una tendencia al aumento en los períodos de reperusión prolongados. **B.** Músculo sóleo para fibras hexagonales. En este caso la disminución más notoria se presenta en 24 horas de reperusión. **C.** Músculo extensor radial longo del carpo para fibras circulares. Presenta tendencia a la disminución a partir de 16 horas y luego se presenta un aumento leve a los ocho días. Nótese que en 32 días de reperusión aún se observan fibras con forma circular. **D.** Músculo sóleo para fibras circulares. El incremento más notorio se da a los ocho días de reperusión, el cual posteriormente tiende a cero.

9.7.4.2.2. En tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial longo del carpo, los cambios fueron significativos para ambas formas, valor p 0.000 cada una.

En el músculo sóleo, para isquemia de tres horas y sus periodos de reperfusión las diferencias fueron también significativas, valor $p < 0.00$

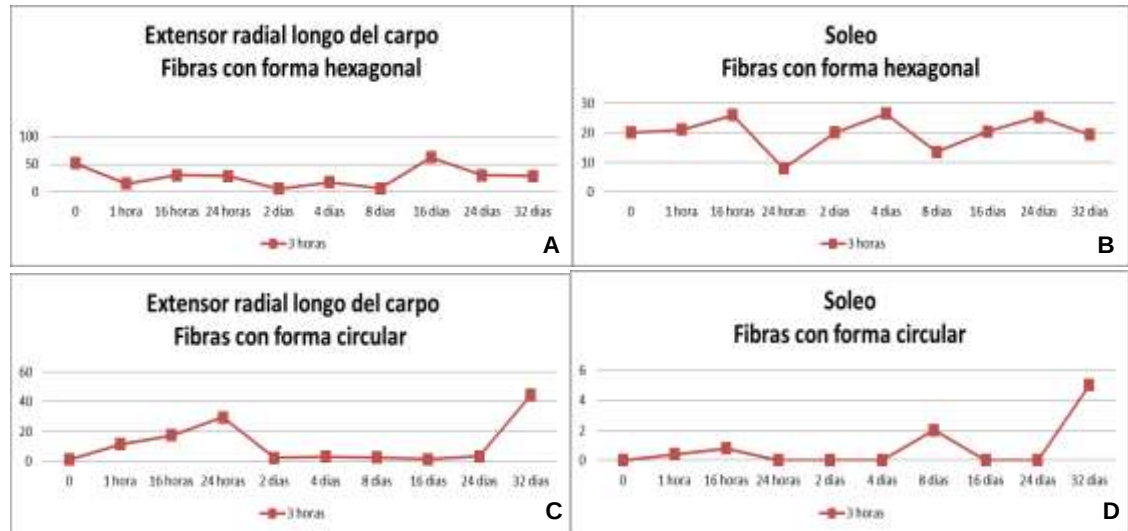


Figura 56. Comparación de las medianas en el conteo de fibras hexagonales y circulares entre los períodos de reperfusión que siguieron a tres horas de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** Músculo extensor radial largo del carpo para fibras hexagonales. Se observa cambios en cero horas y 16 días. Nótese que en períodos como una hora, dos días y ocho días evidencian valores muy pequeños. **B.** Músculo sóleo para fibras hexagonales. En este caso la disminución más notoria se presenta en 24 horas de reperfusión y luego un aumento en la cantidad que permanece hasta el día 32. **C.** Músculo extensor radial largo del carpo para fibras circulares. Presenta tendencia a la disminución a partir de dos días y luego se presenta un aumento a los 32 días de reperfusión. **D.** Músculo sóleo para fibras circulares. El incremento más notorio se da a los 32 días de reperfusión.

9.7.4.2.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia

Para el músculo extensor radial largo del carpo, los cambios en el número de fibras hexagonales no evidenciaron significancia entre los períodos de reperfusión

seguidos de una y tres horas. Por el contrario, las diferencias en la presencia de fibras circulares, fueron significativas, valor p 0.015.

Para el músculo sóleo, no se presenta significancia en la cantidad de fibras hexagonales, contrario a fibras las circulares, valor p 0.033, en el que las diferencias estuvieron en isquemia de una hora con reperfusión de 24 horas y ocho días en relación con las isquemias de tres horas y todos los periodos de reperfusión, excepto 24 horas, ocho días y 16 días.

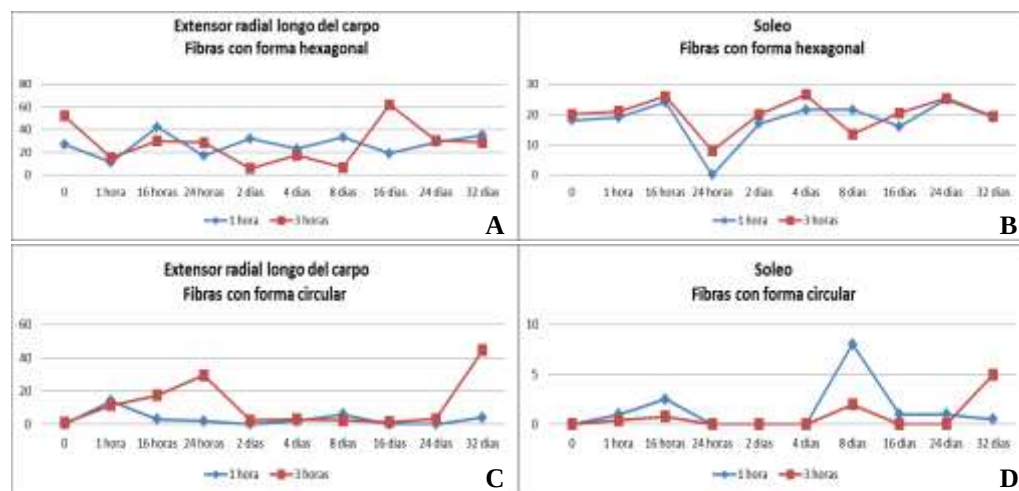


Figura 57. Comparación de las medianas de los cambios en las formas de las fibras en isquemia de una y tres horas. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** La curva presenta mayor variación en isquemia de tres horas cuyo valor más alto se encuentra a los 16 días. **B.** Son pocas las variaciones que se observan en ambas gráficas; a las 24 horas de reperfusión seguido de isquemia de una hora se da un valor cero en el que tampoco hay aumento de fibras con forma circular en D. **C.** Al finalizar la reperfusión hay un aumento de fibras circulares

<i>Extensor radial longo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperfusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	45	45	0	16	16	0

0	27	52	25,00	18	20	2,00
1 hora	11	15	4,00	19	21	2,00
16 horas	42	30	-12,00	24	26	2,00
24 horas	17	28,5	11,50	0	8	8,00
2 días	32	5,7	-26,33	17	20	3,00
4 días	23	17,3	-5,67	21,5	26,5	5,00
8 días	33	6,5	-26,50	21,5	13,5	-8,00
16 días	19	62	43,00	16	20,4	4,40
24 días	29	30,3	1,25	25	25,3	0,33
32 días	35	28,7	-6,33	19	19,3	0,33

Tabla 30. Conteo de fibras con forma hexagonal en ambos músculos. El total para definir control, dependen del campo microscópico.

<i>Extensor radial longo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1,00	0	0	0,00
1 hora	14	11,5	-2,50	1	0,4	-0,60
16 horas	3	17,3	14,33	2,5	0,8	-1,70
24 horas	2	29,5	27,50	0	0	0,00
2 días	0	2,3	2,33	0	0	0,00
4 días	2	3,0	1,00	0	0	0,00
8 días	6	2,5	-3,50	8	2	-6,00
16 días	0	1,3	1,33	1	0	-1,00
24 días	0	3,3	3,33	1	0,0	-1,00
32 días	4	44,5	40,50	0,5	5,0	4,50

Tabla 31. Conteo de fibras con forma circular en ambos músculos

9.7.4.3. Cambios en el tamaño celular

En este parámetro se analizaron los incrementos en el tamaño secundario a edema y la reducción debido a atrofia en las fibras.

9.7.4.3.1. En una hora de isquemia

Para el músculo extensor radial largo del carpo, se evidenció cambios por aumento y disminución en el tamaño. Hubo diferencias significativas al comparar los grupos de reperfusión entre sí, valor p 0.025, tanto para las fibras con edema como las que presentan atrofia.

Para el músculo sóleo, la comparación de isquemia de una hora y sus periodos de reperfusión entre sí, evidencia que las diferencias se encuentran en las fibras que presentan edema, valor p 0.022; pero no en las que presentan atrofia, valor p 0.45.

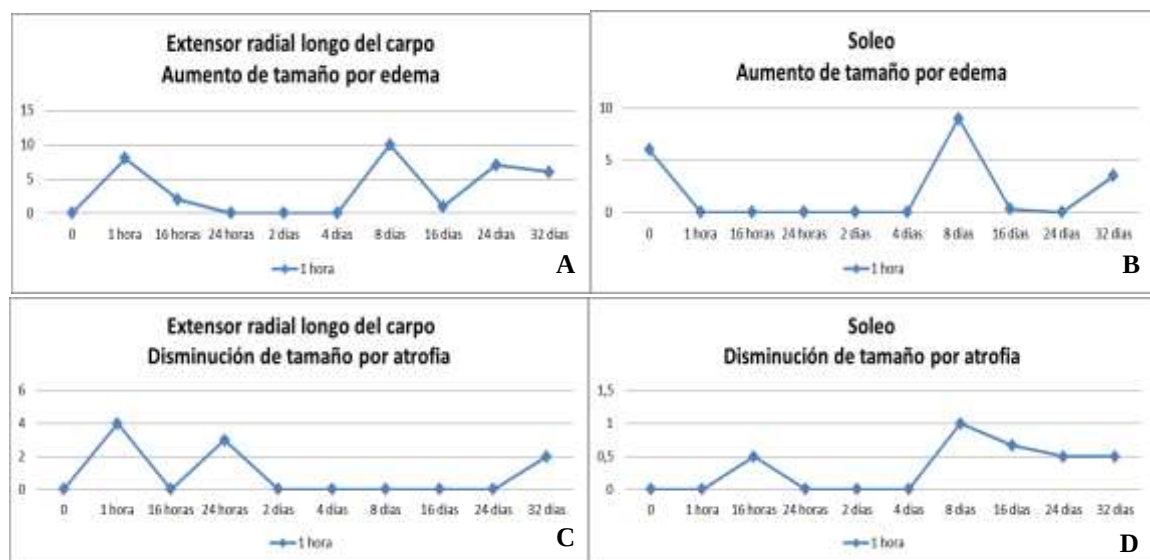


Figura 58. Comparación de las medianas en el conteo de fibras con presencia de edema y atrofia entre los períodos de reperfusión que siguieron a una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** Nótese que en períodos como una hora y ocho días presentan la mayor cantidad de fibras con edema. **B.** Los períodos de cero horas y ocho días presentan el mayor aumento. **C.** En los períodos cortos se presenta aumento en la cantidad de fibras con disminución en el tamaño. **D.** La disminución en el tamaño tiende a ser mayor en los períodos prolongados.

9.7.4.3.2. En tres horas de isquemia

Para el músculo extensor radial largo del carpo, las diferencias fueron significativas al comparar los grupos de perfusión entre sí, valor p 0.000, para las dos variables.

Para el músculo sóleo, en la isquemia de tres horas y sus periodos de perfusión, la significancia se encuentra en la variable atrofia y no en edema, valor p 0.00 y 1.00 respectivamente.

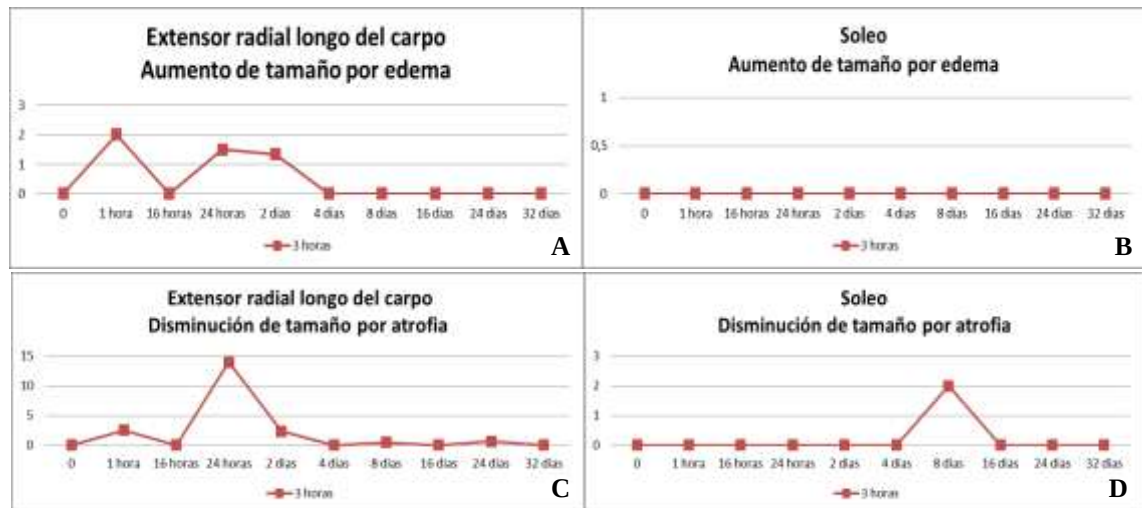


Figura 59. Comparación de las medianas en el conteo de fibras con presencia de edema y atrofia entre los periodos de perfusión que siguieron a tres horas de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** Nótese que en periodos como una hora, 24 horas y dos días presentan la mayor cantidad de fibras con edema. **B.** Ausencia de fibras con mayor tamaño en el campo microscópico. **C.** En los periodos cortos hasta 24 horas se presenta aumento en la cantidad de fibras con atrofia celular. **D.** La disminución en el tamaño tiende a ser mayor a los ocho días de perfusión.

9.7.4.3.3. Comparación entre una y tres horas de isquemia

Para el músculo extensor radial largo del carpo, hubo diferencias significativas entre una y tres horas de isquemia frente a reperfusión en las fibras con edema, valor p 0.01, estas se ubicaron en isquemia de una hora con reperfusión de una hora y 24 horas frente a todos los periodos de reperfusión seguidos a isquemia de tres horas; en isquemia de una hora con reperfusión de cuatro y ocho días frente a isquemia de tres horas con reperfusión de 16 días, 24 días y 32 días. La diferencia entre las fibras con atrofia no fue significativa, valor p 0.71.

Para el músculo sóleo las diferencias si fueron significativas tanto para edema como para atrofia, valor p 0.000. Estas diferencias se encontraron en isquemia de 24 horas y 8 días de reperfusión, frente a isquemia de tres horas y todos los períodos de reperfusión.

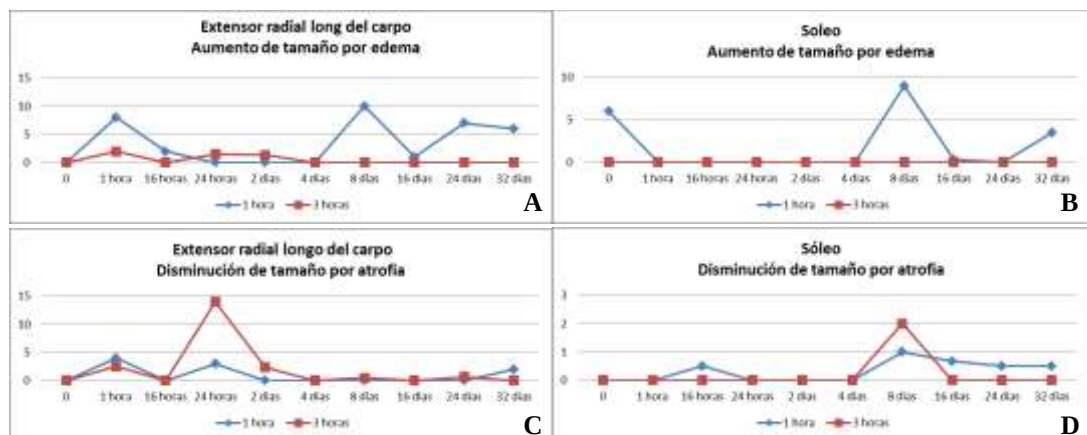


Figura 60. Comparación de las medianas entre edema y atrofia. **A.** Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. Se observan cambios más notorios en una hora de isquemia que en tres horas, estos se dan en el período de reperfusión más corto (una hora) y en los más prolongados (ocho días, 24 días y 32 días). **B.** No se observan cambios en tres horas de isquemia, mientras que en una hora los picos están en cero horas de reperfusión, ocho días y 32 días. **C.** En ambos tiempos de isquemia el cambio más evidente por atrofia se encuentra a las 24 horas de reperfusión, en el resto de periodos las diferencias son pequeñas. **D.** En una hora de isquemia los cambios se encuentran en los periodos prolongados de reperfusión, desde ocho días, mientras que en isquemia de tres horas, el pico esta en ocho días y luego tiende a cero.

Extensor radial longo del carpo				Sóleo		
Reperfusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia

Control	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	6	0	6
1 hora	8	2	-6	0	0	0
16 horas	2	0	-2	0	0	0
24 horas	0	1,5	1,5	0	0	0
2 días	0	1,3	1,33	0	0	0
4 días	0	0,0	0	0	0	0
8 días	10	0	-10	9	0	9
16 días	1	0	-1	0,3	0	0,33
24 días	7	0,0	-7	0	0,0	0
32 días	6	0,0	-6	3,5	0,0	3,5

Tabla 32. Conteo de fibras que presentan aumento en el tamaño.

<i>Extensor radial longo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
1 hora	4	2,5	-1,5	0	0	0
16 horas	0	0,0	0	0,5	0	-0,5
24 horas	3	14	11	0	0	0
2 días	0	2,3	2,33	0	0	0
4 días	0	0,0	0	0	0,0	0
8 días	0	0,5	0,5	1	2	1
16 días	0	0,0	0	0,67	0	-0,66
24 días	0	0,7	0,667	0,5	0,0	-0,5
32 días	2	0,0	-2	0,5	0,0	-0,5

Tabla 33. Conteo de fibras que presentan disminución en el tamaño.

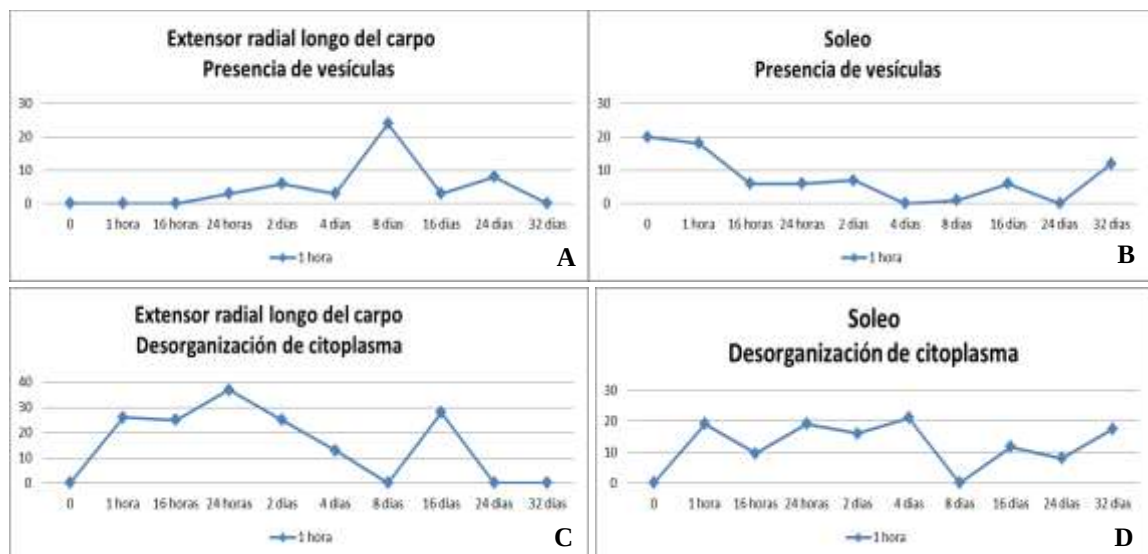
9.7.4.4. Cambios en el citoplasma celular

La desorganización del citoplasma celular fue evidente por tinción no homogénea en el interior de la célula y presencia de fragmentación sin necrosis. Se encontraron fibras musculares con vacuolas citoplasmáticas característica diferente a fractura por congelación, por lo que se realizó el conteo de ambos. Fue incluida también la cantidad de miocitos con infiltración focal parcial y completa en el campo microscópico.

9.7.4.4.1. En una hora de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo, al comparar los períodos de reperfusion entre sí, se encuentra que en isquemia de una hora si hay diferencias significativas, valor p 0.025 para desorganización del citoplasma, presencia de vesículas y fractura por congelación. También es significativo para infiltración focal parcial, valor p 0.025, pero no para infiltración focal completa, valor p 1.00.

Para el músculo sóleo, entre los períodos de reperfusion se encuentra que para isquemia de una hora existen diferencias significativas en las tres variables; valor p 0.011 para desorganización del citoplasma, valor p 0.006 para presencia de vesículas y 0.018 para fractura por congelación. Las diferencias no fueron significativas en las variables infiltración focal parcial y completa, $p > 0.05$.



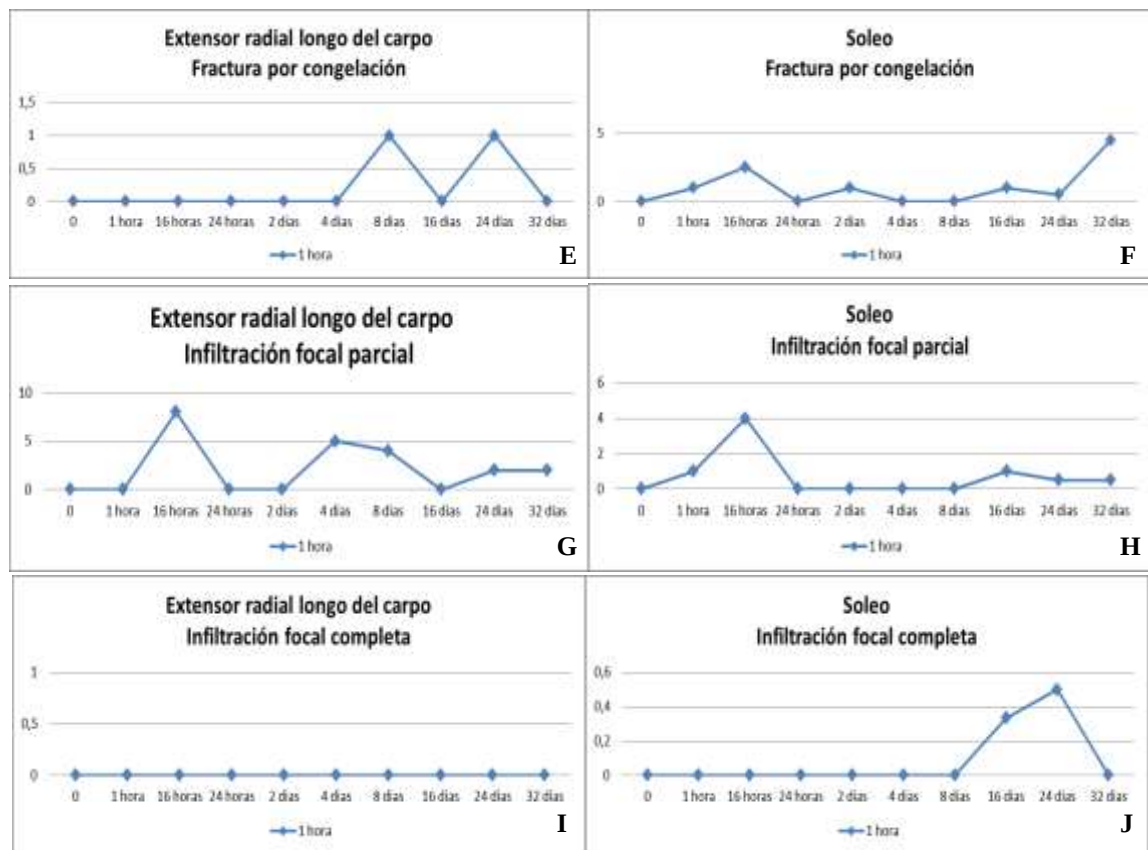
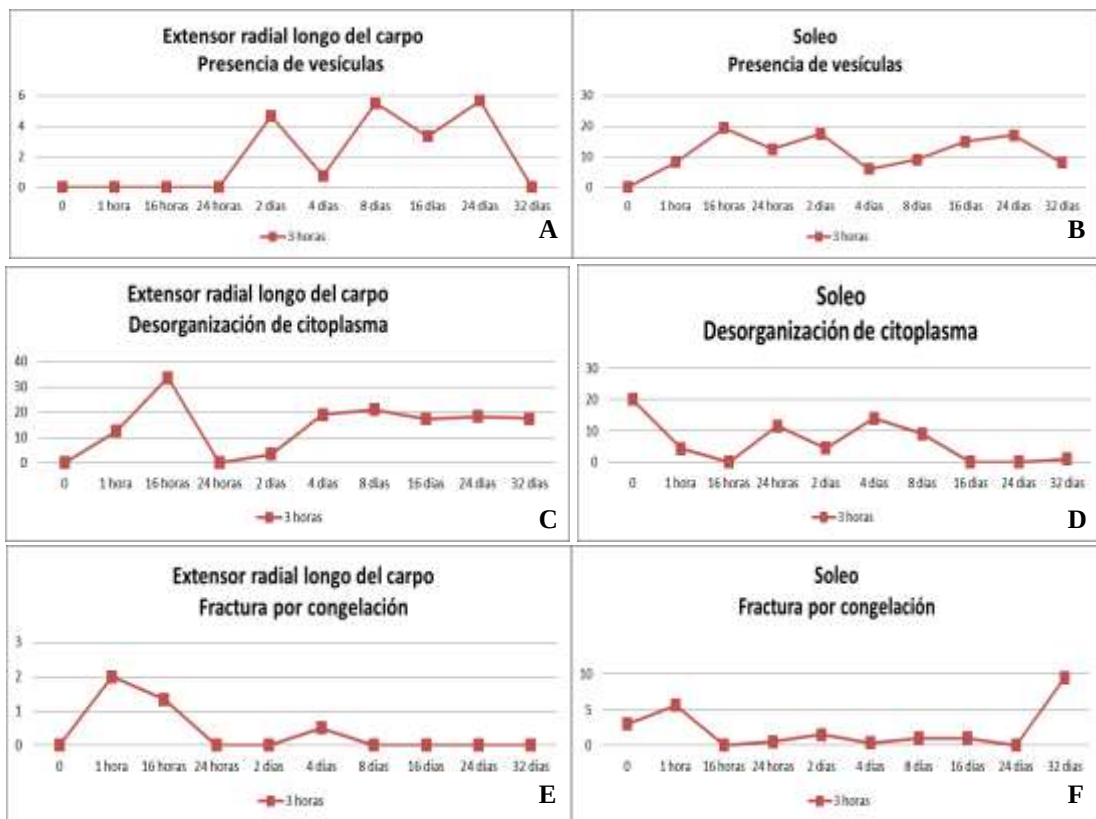


Figura 61. Comparación de las medianas en el conteo de fibras con cambios en el citoplasma entre los períodos de reperfusión que siguieron a una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** El aumento se observa en los períodos prolongados de ocho días y 24 días, para disminuir en el día 32. **B.** La curva tiende al descenso, con aumentos leves a los dos días, 16 días y 32 días. **C.** En los períodos cortos se observa la mayor proporción de fibras con desorganización del citoplasma. Se da una disminución a los ocho días con aumento a los 16 días, nuevamente tiende a cero a los 24 y 32 días. **D.** Son más frecuentes durante la reperfusión la cantidad de fibras con desorganización del citoplasma, se mantiene elevado en el día 32 de reperfusión. **E.** En los períodos cortos no se observa presencia de fibras con fractura por congelación. A los ocho días y 24 días se evidencian algunas fibras con esta característica. **F.** Se evidencian pocas fibras con fractura a las 16 horas, dos días, 16 días y un aumento a los 32 días en el músculo sóleo. **G.** La infiltración dentro de la célula de manera parcial se observó a las 16 horas y cuatro días en mayor proporción. En el día 32 persiste esta característica en algunas fibras. **H.** En su mayoría no se presenta infiltración celular, excepto en una hora, 16 horas y 16 días de reperfusión. En el día 32, aunque aún está presente, la cantidad de fibras con esta característica es baja. **I.** En el músculo extensor radial largo del carpo no se observan fibras con infiltración focal completa en los diferentes campos microscópicos. **J.** La presencia de infiltración en la célula de manera completa, se da en los períodos prolongados de 16 y 24 días. Nuevamente tiende a cero en el día 32.

9.7.4.4.2. En tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo, al comparar los períodos de reperfusion entre sí, se encuentra que en isquemia de tres horas si hay diferencias significativas; valor $p = 0.000$ para desorganización del citoplasma y valor $p = 0.001$ para presencia de vesículas y fractura por congelación. También para infiltración focal parcial el valor p es de 0.010, mientras que para infiltración focal completa el valor p es de 0.092; en esta última variable las diferencias no fueron significativas.

En el músculo sóleo, entre los períodos de reperfusion se encuentra que para isquemia de tres horas, existen diferencias significativas en las tres variables; valor $p = 0.001$ para desorganización del citoplasma, valor $p = 0.000$ para presencia de vesículas y 0.001 para fractura por congelación. Para infiltración focal parcial y completa, también fue significativa para ambos con un valor $p = 0.001$ cada una.



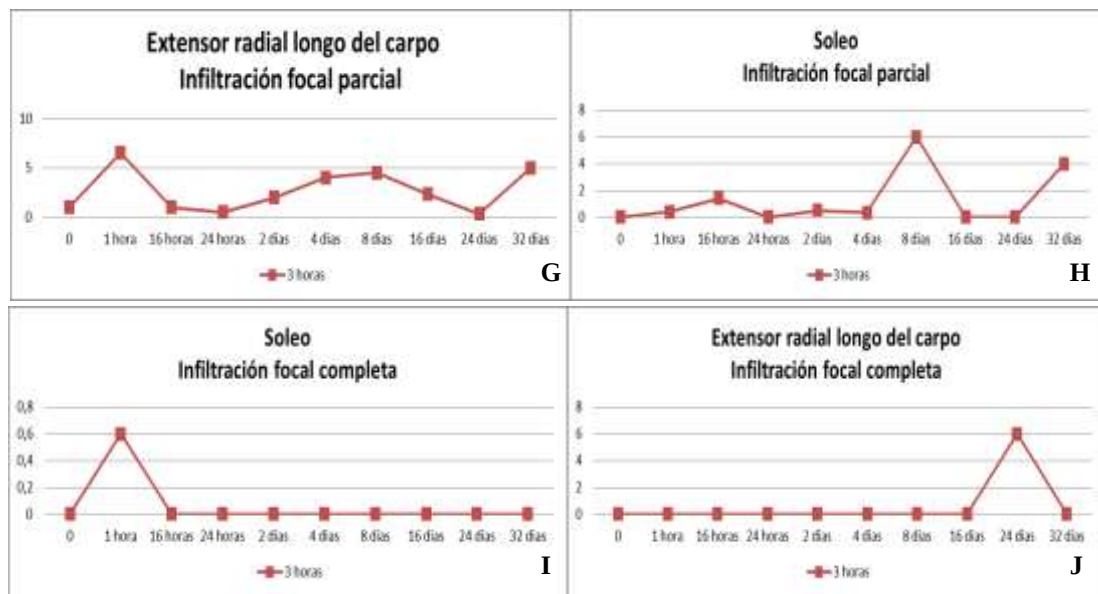


Figura 62. Comparación de las medianas en el conteo de fibras con cambios en el citoplasma entre los períodos de reperfusión que siguieron a tres horas de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** El aumento se observa de dos días, ocho días y 24 días, para disminuir a cero en el día 32. **B.** La curva se mantiene en rangos similares y tiende al descenso, a los 32 días. **C.** Se observa la mayor proporción a las 16 horas con descenso a las 24 horas. Los valores se incrementan y se mantienen hasta el día 32. Nótese que no presenta disminución en los períodos prolongados. **D.** La desorganización del citoplasma en el músculo sóleo se observa desde cero horas donde presenta el valor más elevado, seguido de 24 horas y cuatro días. La tendencia es hacia la disminución desde los ocho días de reperfusión. **E.** En los períodos cortos de cero horas, una hora y 24 horas se identifican la mayor cantidad de fibras que presentan fractura por congelación. **F.** Se evidencian pocas fibras con fractura a las cero horas, una hora, dos días y un aumento a los 32 días en el músculo sóleo. **G.** La infiltración dentro de la célula de manera parcial se observó desde una hora de reperfusión y se mantiene elevado hasta el día 32. **H.** En su mayoría no se presenta infiltración celular, excepto en 16 horas, ocho días y 32 días. **I.** En el músculo extensor radial longo del carpo solo se observan fibras con infiltración focal completa en una hora de reperfusión. **J.** La presencia de infiltración en la célula de manera completa, se da únicamente a los 24 días.

9.7.4.4.3. Comparación isquemia de una hora versus tres horas

En el músculo extensor radial largo del carpo no se encontraron diferencias significativas entre los periodos de reperfusión seguidos a una y tres horas de isquemia, para desorganización del citoplasma, presencia de vacuolas y fractura por congelación; valor $p > 0.05$ en las tres variables.

Respecto a las variables de infiltración focal parcial y completa, en el músculo extensor radial largo del carpo no se encontró significancia entre una y tres horas de isquemia, valor $p > 0.05$ en ambas.

En el músculo sóleo se encontraron diferencias significativas para desorganización del citoplasma y presencia de vacuolas, valor p 0.000 y 0.003 respectivamente. En la variable desorganización del citoplasma, las diferencias se establecieron en isquemia de una hora más reperfusión de 16 días con isquemia de tres horas más reperfusión de 16 horas; también en isquemia de una hora más reperfusión de 24 días con isquemia de tres horas más reperfusión de una hora, 24 horas, cuatro días, 16 días y 32 días. Para la variable presencia de vacuolas, las diferencias se encontraron en isquemia de una hora más reperfusión de dos días con isquemia de tres horas más reperfusión de 24 horas y 24 días; así mismo, en isquemia de una hora y reperfusión de 16 días con isquemia de tres horas y reperfusión de una hora, 24 horas, cuatro días y 24 días.

Para la variable fractura por congelación no se evidencia diferencias, valor $p > 1.000$.

En las variables infiltración focal parcial y completa, no se evidencian diferencias significativas al comparar una y tres horas de isquemia, valor $p > 0.05$.

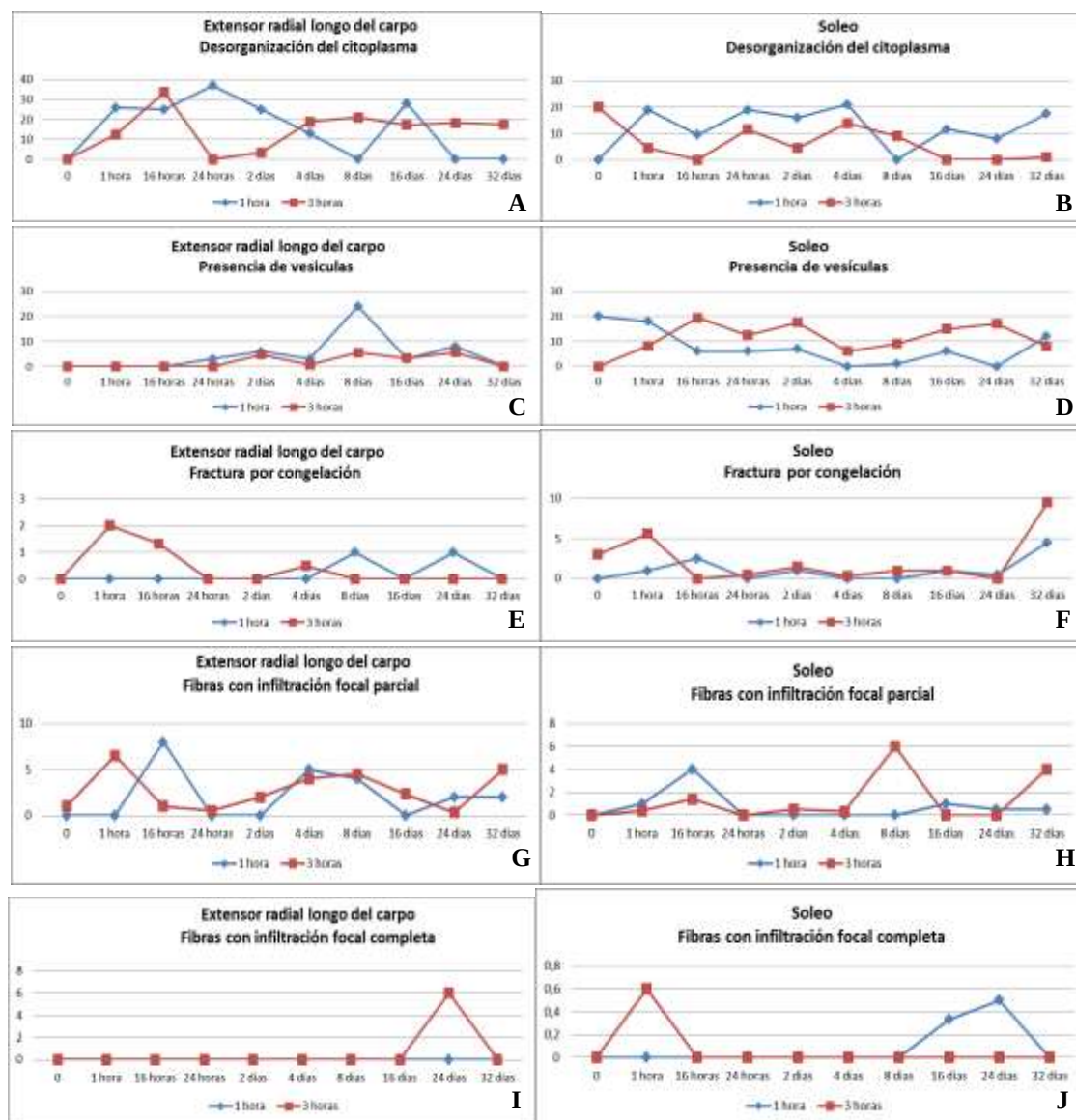


Figura 63. Comparación de las medianas de los cambios en el citoplasma celular para ambos músculos. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** Las gráficas se comportan de manera diferente en una hora y tres horas. Para isquemia de una hora los cambios en su mayoría se encuentran al inicio de la reperfusión para luego disminuir; mientras que en tres horas, estos se mantienen en los periodos prolongados. **B.** Son pocas las diferencias entre una y tres horas isquemia, los cambios son mayores en una hora de isquemia. **C.** La cantidad de vacuolas en el citoplasma es baja para ambos periodos de isquemia, excepto por el pico en ocho días de reperfusión para isquemia de una hora. Hacia el final de la reperfusión, los valores tienden a cero. **D.** Las vacuolas se observan en mayor cantidad en isquemia de tres horas; ambas gráficas se comportan de manera contraria. En isquemia de tres horas inicialmente aumenta para luego disminuir, mientras que en

isquemia de una hora, disminuye y luego aumenta. **E.** Es mayor en los períodos de reperfusión iniciales para isquemia de tres horas, en una hora es escaso, con dos picos a los ocho y 24 días de reperfusión. **F.** La tendencia es igual en una y tres horas de isquemia. Es mayor la cantidad hacia el día 32 de reperfusión. **G.** Los cambios fluctúan en todos los periodos de reperfusión tanto en isquemia de una hora como de tres horas, ambas gráficas presentan un comportamiento similar. **H.** Son menores las variaciones en este músculo y evidencia que se encuentra en mayor cantidad en isquemia de tres horas que en una hora. **I.** Escasa la infiltración focal completa, excepto en 24 días de reperfusión seguido a tres de isquemia. En una hora de isquemia no se presenta. **J.** Presentan comportamientos contrarios, en isquemia de tres horas se da un pico al inicio de la reperfusión (una hora), mientras que en isquemia de una hora se da en los periodos prolongados (16 y 24 días) y luego tiende a cero en el día 32.

<i>Extensor radial longo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperfusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0,00	0	20	20,00
1 hora	26	12,5	-13,50	19	4,4	-14,60
16 horas	25	33,7	8,67	9,5	0	-9,50
24 horas	37	0	-37,00	19	11,5	-7,50
2 días	25	3,3	-21,67	16	4,5	-11,50
4 días	13	19,0	6,00	21	14,0	-7,00
8 días	0	21	21,00	0	9	9,00
16 días	28	17,3	-10,67	11,7	0	-11,67
24 días	0	18,3	18,33	8	0,0	-8,00
32 días	0	17,5	17,50	17,5	1,0	-16,50

Tabla 34. Conteo de fibras con desorganización del citoplasma.

<i>Extensor radial longo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperfusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0,00	20	0	20
1 hora	0	0	0,00	18	8,2	9,8
16 horas	0	0,0	0,00	6	19,4	-13,4
24 horas	3	0	-3,00	6	12,5	-6,5
2 días	6	4,7	-1,33	7	17,5	-10,5
4 días	3	0,8	-2,25	0	6,0	-6
8 días	24	5,5	-18,50	1	9	-8
16 días	3	3,3	0,33	6,00	15	-9
24 días	8	5,7	-2,33	0	17,0	-17
32 días	0	0,0	0,00	12	8,0	4
Total general	4,7	2,2	-2,50	7,1	12,3	-5,24

Tabla 35. Conteo de fibras con presencia de vacuolas citoplasmáticas

<i>Extensor radial largo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0,00	0	3	3,00
1 hora	0	2	2,00	1	5,6	4,60
16 horas	0	1,3	1,33	2,5	0	-2,50
24 horas	0	0	0,00	0	0,5	0,50
2 días	0	0,0	0,00	1	1,5	0,50
4 días	0	0,5	0,50	0	0,3	0,33
8 días	1	0	-1,00	0	1	1,00
16 días	0	0,0	0,00	1,00	1	0,00
24 días	1	0,0	-1,00	0,5	0,0	-0,50
32 días	0	0,0	0,00	4,5	9,5	5,00

Tabla 36. Conteo de fibras con presencia de fractura por congelación

<i>Extensor radial largo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1,00	0	0	0,00
1 hora	0	6,5	6,50	1	0,4	-0,60
16 horas	8	1,0	-7,00	4	1,4	-2,60
24 horas	0	0,5	0,50	0	0	0,00
2 días	0	2,0	2,00	0	0,5	0,50
4 días	5	4,0	-1,00	0	0,3	0,33
8 días	4	4,5	0,50	0	6	6,00
16 días	0	2,3	2,33	1	0	-1,00
24 días	2	0,3	-1,67	0,5	0,0	-0,50
32 días	2	5,0	3,00	0,5	4,0	3,50

Tabla 37. Conteo de fibras con infiltración focal parcial

<i>Extensor radial longo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	1h	3h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
1 hora	0	0	0	0	0,6	0,6
16 horas	0	0,0	0	0	0	0
24 horas	0	0	0	0	0	0
2 días	0	0,0	0	0	0	0
4 días	0	0,0	0	0	0	0
8 días	0	0	0	0	0	0
16 días	0	0,0	0	0,33	0,00	-0,33
24 días	0	6,0	6	0,5	0,0	-0,5
32 días	0	0,0	0	0	0,0	0
Total general	0	0,7	0,72	0,1	0,1	-0,01

Tabla 38. Conteo de fibras con infiltración focal completa

9.7.4.5. Cambios en la localización de los núcleos de los miocitos

Se analizó el total de fibras en el campo microscópico que presentan núcleos periféricos (normal), núcleos centrales (regeneración) y ausencia de núcleos (pérdida).

9.7.4.5.1. En una hora de isquemia

En el músculo extensor radial longo del carpo, al comparar entre sí los períodos de reperusión, se observa significancia en isquemia de una hora, valor p 0.025 en las tres variables.

En el músculo sóleo, entre los períodos de reperusión se encuentra que para una hora de isquemia, los cambios son significativos para la presencia de núcleos periféricos, valor p 0.020 y para los núcleos con localización central, valor p 0.001.

En la variable ausencia de núcleos las diferencias no son significativas, valor p 1.000.

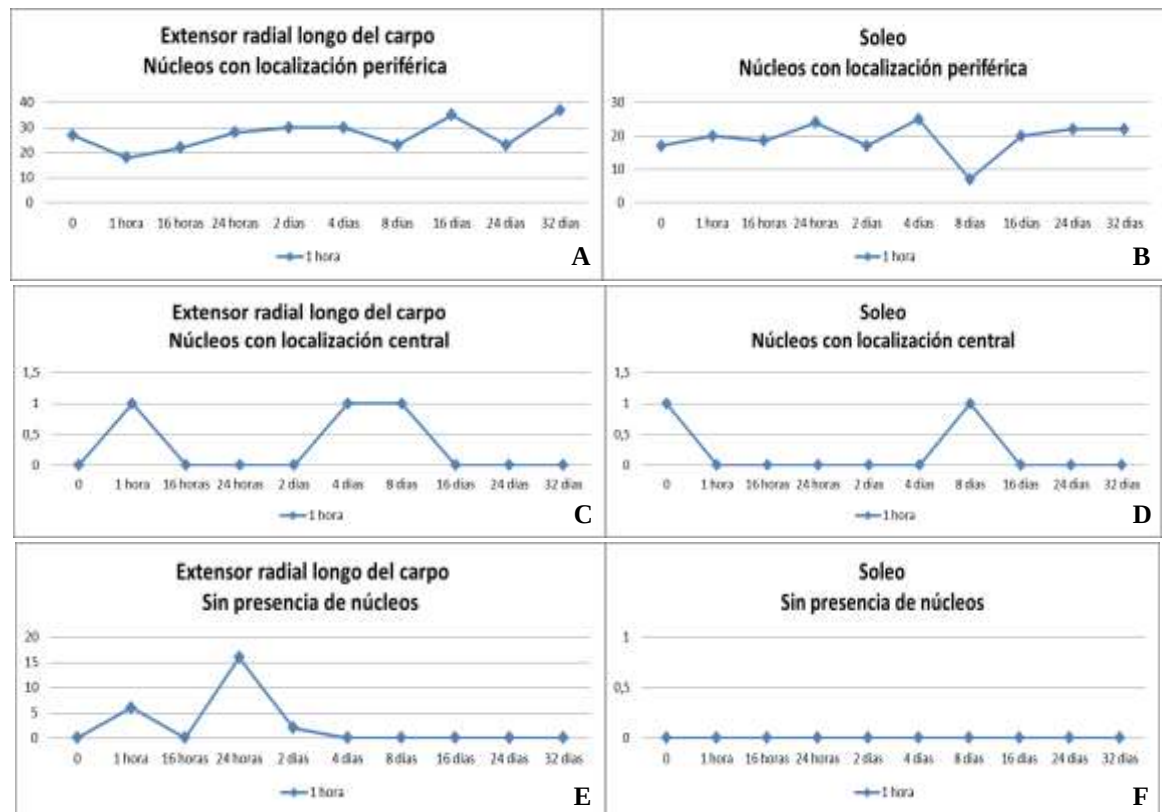


Figura 64. Comparación de las medianas en el conteo de fibras con cambios en la localización de los núcleos entre los períodos de reperusión que siguieron a una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** Si bien no se da una tendencia a cero, la disminución se observa en una hora, ocho días y 24 días. **B.** La curva se mantiene en rangos similares, con un descenso marcado a los ocho días. **C.** Se observa la mayor proporción de núcleos centrales en una hora, cuatro días y ocho días, posteriormente los valores tienden a cero. **D.** La presencia de núcleos centrales se observa en cero horas y ocho días de reperusión. Luego los valores tienden a cero. **E.** En los períodos cortos de una hora y 24 horas se identifican fibras sin evidencia de núcleos, en los demás períodos de reperusión no se da esta característica. **F.** Todos los valores corresponden a cero. En todas las fibras se identificaron núcleos, fuesen de localización periférica o central.

9.7.4.5.2. En tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo, en tres horas de isquemia los cambios entre períodos son significativos, valor p 0.000 para las tres variables.

En el músculo sóleo, las diferencias son significativas para las fibras que presentan núcleos con localización periférica, valor p 0.001 y para las de localización central, valor p 0.012. En las fibras con núcleos ausentes no se observa que las diferencias sean significativas, valor p 1.00.

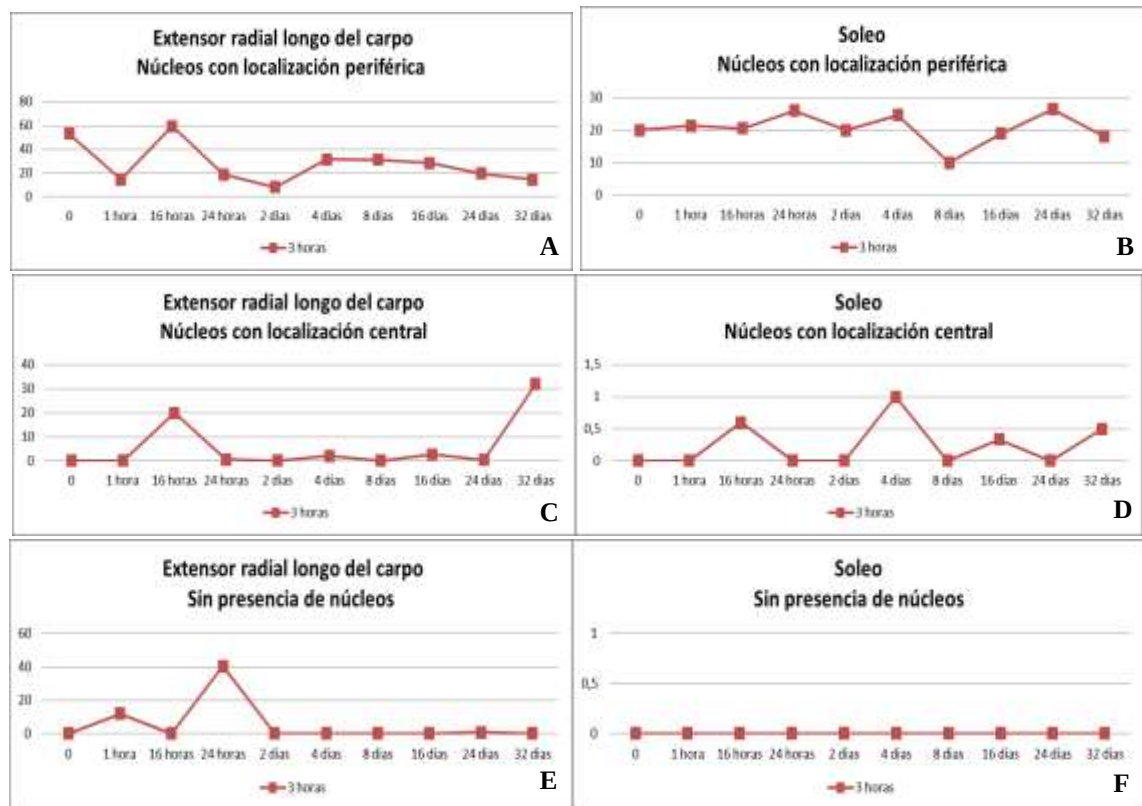


Figura 65. Comparación de las medianas en el conteo de fibras con cambios en la localización de los núcleos entre los períodos de reperfusión que siguieron a tres horas de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** En su mayoría, las fibras presentan núcleos periféricos, una reducción en la cantidad es notoria en una hora, dos días y 32 días. **B.** Las variaciones en la gráfica son pocas, la disminución se observa en reperfusión de ocho días. **C.** Se observa la mayor proporción de núcleos centrales en 16 horas y un aumento en 32 días. En los demás períodos la cantidad es muy baja o de cero. **D.** La presencia de núcleos centrales se observa en 24 horas, cuatro días, 16 días y 32 días de reperfusión. En los demás períodos la cantidad es cero. **E.** En los períodos cortos de una

hora y 24 horas se identifican fibras sin evidencia de núcleos, en los demás períodos de reperusión no se da esta característica. **F.** Todos los valores corresponden a cero.

9.7.4.5.3. Comparación entre una y tres horas de ischemia

En el músculo extensor radial largo del carpo, al comparar ischemia de una y tres horas se encuentra que los cambios no son significativos en ninguna de las variables.

En el músculo sóleo, la comparación de las medianas entre una y tres horas no evidenció significancia en las diferencias de ninguna de las tres variables.

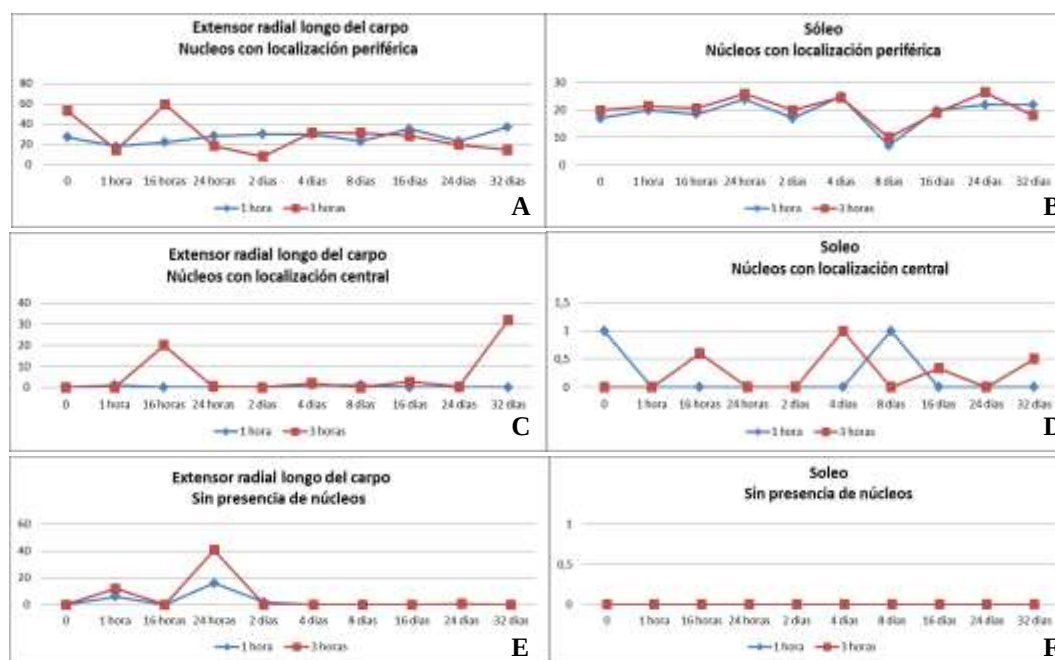


Figura 66. Comparación de las medianas de los cambios en la localización de los núcleos de los miocitos para ambos músculos. En todas las gráficas se observa que los períodos de reperusión seguidos de ischemia de una y tres horas, presentan un comportamiento similar con algunas excepciones. **A.** Mientras que en ischemia de una hora la curva permanece en el mismo rango, se observan variaciones en ischemia de tres horas en reperusión cero, 16 horas y disminución en dos días, así como en 32 días. **B.** No hay diferencias en los cambios. El conteo de núcleos con localización periférica es igual tanto en una hora como en tres horas. Entre períodos se observa una disminución a los ocho días y un aumento leve a los 24 días de reperusión seguido a tres horas de ischemia. **C.** Los cambios se presentan en ischemia de tres horas con un pico a la 16

horas y 32 días de reperusión. En isquemia de una hora todos los valores corresponden a cero. **D.** Los cambios son más evidentes en isquemia de tres horas, los valores más altos se encuentran a las 16 horas, cuatro días y 32 días de reperusión. En isquemia de una hora también hay cambios con valores elevados en cero horas y ocho días de reperusión. **E.** Núcleos no evidentes se presentaron en isquemia de una y tres horas en una hora y 24 horas de reperusión. En los demás períodos no se presentó esta característica. **F.** En el músculo sóleo todas las células en el campo microscópicos presentaron núcleos periféricos o centrales, según el período de reperusión.

<i>Extensor radial longo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	45	45	0	16	16	0
0	27	53	26,00	17	20	3,00
1 hora	18	14,5	-3,50	20	21,4	1,40
16 horas	22	59,3	37,33	18,5	20,6	2,10
24 horas	28	18,5	-9,50	24	26	2,00
2 días	30	8,0	-22,00	17	20	3,00
4 días	30	31,3	1,25	25	24,7	-0,33
8 días	23	31	8,00	7	10	3,00
16 días	35	28,3	-6,67	20	19	-1,00
24 días	23	19,7	-3,33	22	26,5	4,50
32 días	37	14,5	-22,50	22	18,0	-4,00

Tabla 39. Conteo de fibras que presentan núcleos de localización periférica. Para el control debe ser el total de fibras, esto depende del campo microscópico.

<i>Extensor radial longo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0,00	1	0	1,00
1 hora	1	0	-1,00	0	0	0,00
16 horas	0	20,0	20,00	0	0,6	-0,60
24 horas	0	0,5	0,50	0	0	0,00
2 días	0	0,0	0,00	0	0	0,00
4 días	1	2,0	1,00	0	1	-1,00
8 días	1	0	-1,00	1	0	1,00
16 días	0	2,7	2,67	0	0,33	-0,33
24 días	0	0,3	0,33	0	0,0	0,00
32 días	0	32,0	32,00	0	0,5	-0,50

Tabla 40. Conteo de fibras que presentan núcleos de localización central

<i>Extensor radial longo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
1 hora	6	12	6	0	0	0
16 horas	0	0,0	0	0	0	0
24 horas	16	40,5	24,5	0	0	0
2 días	2	0,0	-2	0	0	0
4 días	0	0,0	0	0	0,0	0
8 días	0	0	0	0	0	0
16 días	0	0,0	0	0,00	0	0
24 días	0	0,7	0,66	0	0,0	0
32 días	0	0,0	0	0	0,0	0

Tabla 41. Conteo de fibras con núcleos no evidentes o ausentes.

9.7.4.6. Evidencia de necrosis

Se analizó la presencia de células con evidencia de necrosis, las cuales presentan características como citoplasma pálido y fragmentado con pérdida de la morfología celular.

9.7.4.6.1. En una hora de isquemia

En el músculo extensor radial longo del carpo, al comparar entre sí los períodos de reperusión, se observa que en una hora de isquemia las diferencias son significativas, valor p 0.025.

En el músculo sóleo, al comparar entre sí los periodos de reperusión, no se encuentran diferencias significativas en una hora de isquemia.

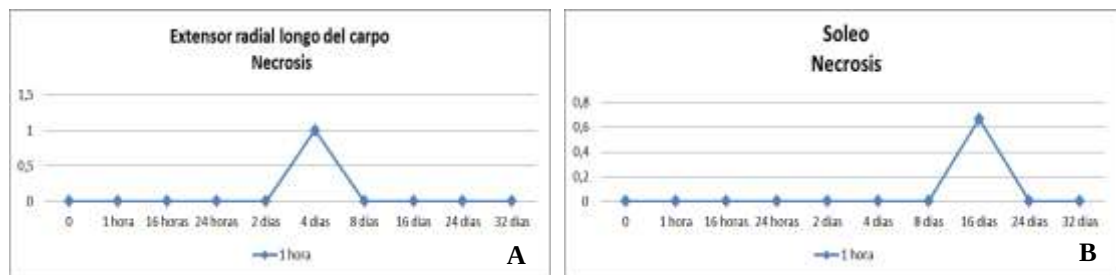


Figura 67. Comparación de las medianas en el conteo de fibras con evidencia de necrosis que siguieron a una hora de ischemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** Solo se evidenció muerte celular a los cuatro días de perfusión, los demás valores corresponde a cero. **B.** Solo se evidenció muerte celular a los 16 días de perfusión, los demás valores corresponde a cero.

9.7.4.6.2. En tres horas de ischemia

En el músculo extensor radial largo del carpo, al comparar entre sí los períodos de perfusión, se observa que las diferencias son significativas, valor p 0.000.

En el músculo sóleo, se observó también que las diferencias son significativas, valor p 0.037.

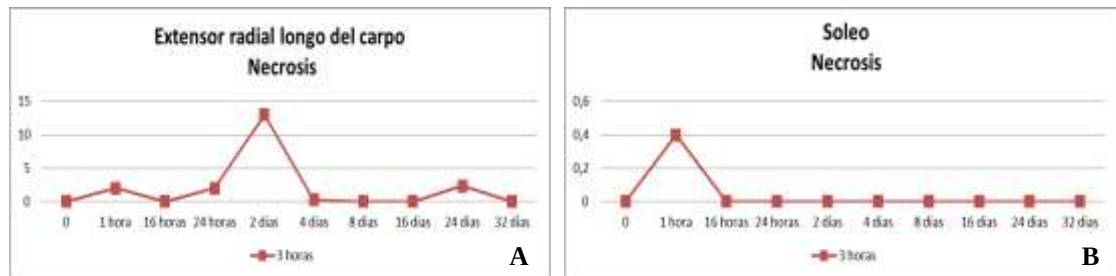


Figura 68. Comparación de las medianas en el conteo de fibras con evidencia de necrosis que siguieron a tres horas de ischemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** Se evidenció muerte celular en una hora, 24 horas, dos días con la mayor proporción y 24 días. Corresponde a cero en el día 32. **B.** Solo se evidenció muerte celular en una hora de perfusión, los demás valores corresponde a cero.

9.7.4.6.3. Comparación entre una y tres horas de ischemia

Para el músculo extensor radial largo del carpo, la comparación de las medianas entre una y tres horas de ischemia fue significativo, valor p 0.017. Las diferencias se encuentran en ischemia de una hora más reperusión de una hora y dos días, con todos los periodos de reperusión seguidos a tres horas de ischemia.

Para el músculo sóleo no se encontraron diferencias significativas entre una y tres horas de ischemia.

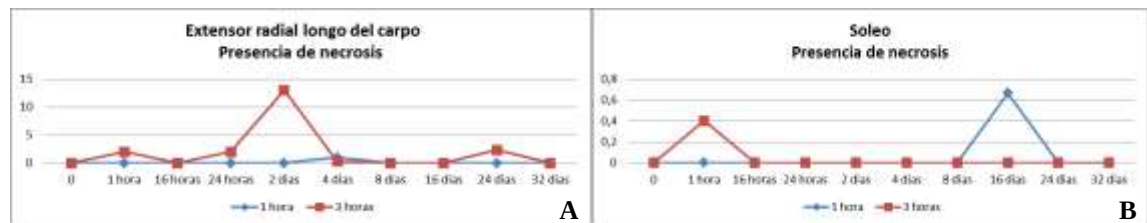


Figura 69. Comparación de las medianas de las fibras que presentan necrosis en ambos músculos. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** Diferencia más notoria en ischemia de tres horas a los dos días de reperusión. **B.** En el sóleo, la evidencia de necrosis en una hora de ischemia ocurre a los 16 días de reperusión; en ischemia de tres horas se presenta en una hora de reperusión.

<i>Extensor radial largo del carpo</i>				<i>Sóleo</i>		
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0,00	0	0	0,00
1 hora	0	2	2,00	0	0,4	0,40
16 horas	0	0,0	0,00	0	0	0,00
24 horas	0	2	2,00	0	0	0,00
2 días	0	13,0	13,00	0	0	0,00
4 días	1	0,3	-0,75	0	0,0	0,00
8 días	0	0	0,00	0	0	0,00
16 días	0	0,0	0,00	0,67	0	-0,67
24 días	0	2,3	2,33	0	0,0	0,00
32 días	0	0,0	0,00	0	0,0	0,00

Tabla 42. Conteo de fibras con evidencia de necrosis en ambos músculos.

9.7.4.7. Presencia de mioblastos o miotubos (regeneración)

Los miotubos/mioblastos corresponden a estadios tempranos de la miogénesis, en este caso, por recuperación post isquémica. Los mioblastos se caracterizan por ser células pequeñas, redondas, con núcleo central grande muy basófilo y citoplasma eosinófilo intenso. Los miotubos son células más grandes, definidas, con núcleo central y citoplasma menos eosinófilo (Armand et al., 2011).

9.7.4.7.1. En una hora de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo no se encontraron diferencias significativas, valor $p > 0.05$.

En el músculo sóleo tampoco fueron significativas las diferencias encontradas, valor $p > 0.05$.

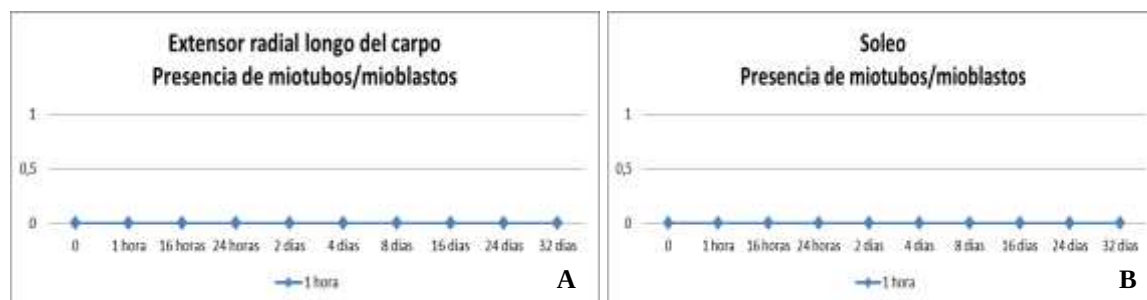


Figura 70. Comparación de las medianas en el conteo de fibras con evidencia de mioblastos y miotubos que siguieron a una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. Tanto en **A** como en **B** no se evidenciaron células con características de mioblastos o miotubos.

9.7.4.7.2. En tres horas de isquemia

En el músculo extensor radial largo del carpo, se encontró que las diferencias fueron significativas, valor $p < 0.000$.

En el músculo sóleo, las diferencias no fueron significativas, valor $p > 0.05$.

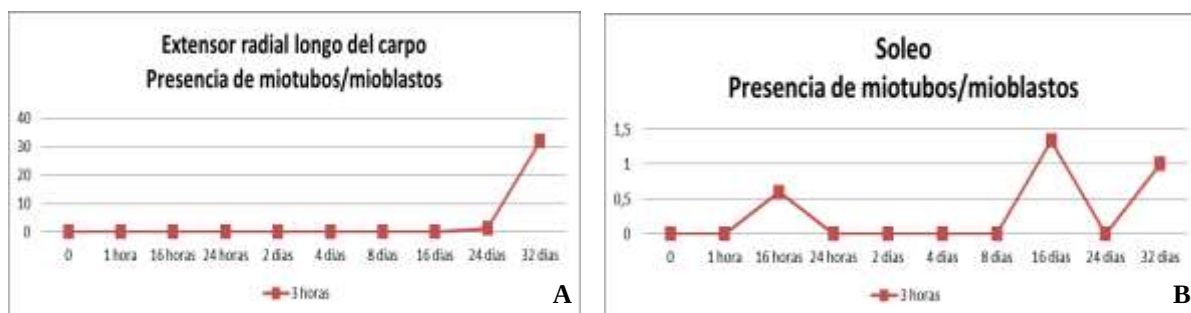


Figura 71. Comparación de las medianas en el conteo de fibras con evidencia de mioblastos y miotubos que siguieron a una hora de isquemia. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** Se evidenció características de regeneración a los 32 días de reperusión. **B.** El músculo sóleo presentó mioblastos/miotubos en 16 horas, 16 días y 32 días. En ambos músculos las características de regeneración celular se mantienen en los períodos más prolongados de reperusión.

9.7.4.7.3. Comparación entre una y tres horas de ischemia

Se encuentra que en el músculo extensor radial largo del carpo al comparar una y tres horas de ischemia no se encuentran diferencias significativas.

En el músculo sóleo, las comparaciones no fueron significativas en una y tres horas de ischemia valor $p > 0.05$.

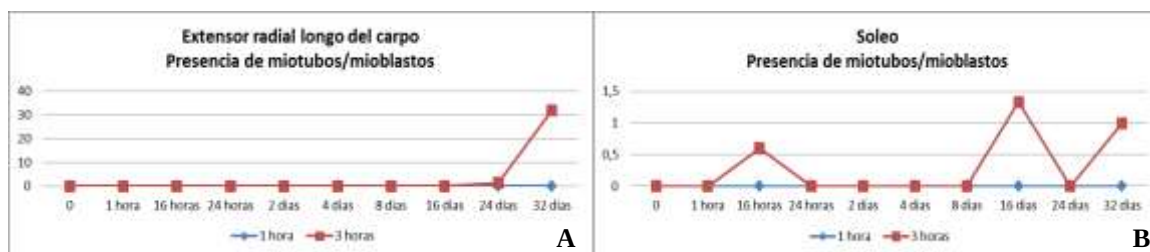


Figura 72. Comparación de las medianas en ambos músculos de la presencia de miotubos o mioblastos. Eje X: Tiempo; Eje Y: Número. **A.** No se observan diferencias, excepto en ischemia de tres horas y 32 días de reperusión. **B.** Los cambios más notorios se observan en ischemia de tres horas a las 16 horas, 16 días y 32 días de reperusión.

Extensor radial longo del carpo				soleo		
Reperusión	1 h	3 h	Diferencia	1 h	3 h	Diferencia
Control	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0,00	0	0	0,00
1 hora	0	0	0,00	0	0	0,00
16 horas	0	0,0	0,00	0	0,6	0,60
24 horas	0	0	0,00	0	0	0,00
2 días	0	0,0	0,00	0	0	0,00
4 días	0	0,0	0,00	0	0	0,00
8 días	0	0	0,00	0	0	0,00
16 días	0	0,0	0,00	0,00	1,33	1,33
24 días	0	1,3	1,33	0	0,0	0,00
32 días	0	32,0	32,00	0	1,0	1,00

Tabla 43. Conteo de miotubos/mioblastos en ambos músculos.

10. Discusión

La isquemia o interrupción de la circulación sanguínea hacia un determinado órgano o tejido, acarrea lesiones que pueden ser o no reversibles con manifestaciones que van desde inflamación, alteraciones en los sustratos metabólicos intramusculares como el glucógeno, la fosfocreatina y la disminución en los niveles de ATP; varios estudios sustentan estas manifestaciones, entre ellos, el realizado por Carvalho et al. en 1997, en el que establecieron que desde una hora de isquemia se ven afectadas negativamente estas concentraciones, mientras que, en dos y tres horas de isquemia aumentaron los niveles de lactato (Carvalho et al., 1996).

Al ser liberado el estímulo que generó la isquemia, retorna el flujo sanguíneo y se da la reperusión; Carmo-Araujo, en 2007, describieron los efectos de la isquemia inducida de cuatro horas en el músculo sóleo, seguida de una hora de reperusión, los cuales incluyeron cambios en la forma de las células musculares, disminución de su tamaño y aumento en los espacios que ocupa el tejido conectivo (Carmo-Araújo et al., 2007).

Debido a que diferentes situaciones, desde eventos quirúrgicos hasta eventos traumáticos, pueden conllevar a periodos cortos o prolongados de isquemia y reperusión que afectan tanto las fibras musculares como la matriz extracelular intramuscular, es importante establecer las características que cambian en especial en el tejido conectivo, puesto que es aquel que provee a los miocitos irrigación e inervación, por lo que cualquier alteración en su naturaleza, genera efectos desfavorables en los procesos de nutrición y respuesta a los estímulos nerviosos.

El músculo extensor radial largo del carpo presenta características morfológicas y funcionales diferentes a las del sóleo, siendo una de ellas, la distribución de los tipos de fibras. Las tipo I, oxidativas o de contracción lenta se encuentran en mayor proporción en el sóleo; mientras que las tipo IIB, glucolíticas o de contracción rápida, en el extensor radial largo del carpo. Esta característica puede verse afectada a lo largo de la reperusión. Los estudios de reperusión prolongada hasta el día 14 como los llevados a cabo por Walters et al. 2008 y Woistake et al, 1998, encontraron que el tipo de fibra que predomina en el músculo influye en la recuperación del mismo y que cada músculo es capaz de generar mecanismos de adaptación morfológica y fisiológica, que son apreciables durante la reperusión (Walters et al., 2008) (Woitaske & McCarter, 1998).

Entre los estudios recientes relacionados con periodos de reperfusión prolongados, se incluye el realizado por Corona & Rathbone, 2014; en el que se indujo isquemia de dos horas y reperfusión hasta 28 días, con el fin de evaluar la velocidad de recuperación de un músculo al inyectar células mesenquimales provenientes de médula ósea; así mismo, el realizado por (Sassoli et al., 2014), en el que se tuvo en cuenta la diferenciación celular y la función de las células del conectivo en la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular. En 2010, Vignaud et al., en su estudio realizado en ratones a los que les indujeron isquemia de tres horas con bandas elásticas, con reperfusión de 14, 28 y 56 días, demostraron una recuperación completa del músculo tibial anterior, predominantemente glucolítico, tanto histológica como funcional, en el día 56 (Vignaud et al., 2010). Por último, en el trabajo realizado por Carvalho, et al., en 1995 en ratas Wistar hembras, las cuales fueron sometidas a dos horas de isquemia a 300 mmHg, con reperfusión hasta siete semanas, evaluaron la capacidad contráctil entre fibras de contracción rápida y lenta a lo largo de la reperfusión, sin embargo, no se incluyeron los cambios histológicos que ocurrieron en los músculos que seleccionaron (Carvalho, Hollett, & McKee, 1995).

El desarrollo del presente modelo de isquemia inducida y reperfusión, implicó una planeación minuciosa desde la primera fase con el fin de evitar muertes innecesarias, en especial a largo de la reperfusión y pérdida de muestras para estudio histológico.

La discusión se orientará sobre los aspectos relevantes en el uso del torniquete, en la aplicación de las tinciones histoquímicas, en la lesión por reperfusión y las características que cambiaron tanto del extensor radial largo del carpo como el sóleo.

10.1. Torniquete neumático y tinciones histoquímicas

El dispositivo se diseñó de manera que fuese similar al utilizado en el área quirúrgica, mantuviese las presiones de isquemia requeridas y evitara lesionar la piel en las extremidades. El uso del torniquete neumático en la presente investigación para inducir isquemia de manera experimental, ya fue descrito por autores como Walters 2008, Woitaske 1998, Hocker 2013, Corona 2013.

Algunos autores defienden la técnica de oclusión arterial directa como la más efectiva para producir isquemia (Itoh & Kudoh, 2011) (Ghaly & Marsh, 2010), dado

que se obstruye el flujo sanguíneo desde el nivel más proximal permitido; sin embargo, al ser un procedimiento invasivo, acarrea riesgos durante el postquirúrgico que pueden comprometer la integridad del biomodelo y de la muestra. Otros autores utilizaron un torniquete sencillo en el que se da obstrucción del flujo sanguíneo, pero no se tiene conocimiento sobre el grado de presión aplicada (Carmo-Araújo et al., 2007), por lo que no es posible asegurar la interrupción sanguínea capilar. En 2008 Walters et al., llevaron a cabo el modelo de isquemia y reperfusión mediante un torniquete neumático digital, cuya presión estuvo por encima de 230 mmHg. Mediante evaluación doppler de vasos sanguíneos determinaron que esta presión con un margen de seguridad de ± 20 mmHg, generaba obstrucción incluso en la microcirculación (Walters et al., 2008); razón por la cual, en la presente investigación la presión utilizada en los grupos experimentales fue superior a 250 mm Hg. La principal ventaja fue la reducción de los riesgos de infección e hipotermia, al aplicarse el modelo de manera no invasiva.

En el procesamiento de las muestras disecadas, se encuentra que a pesar que existen múltiples protocolos relacionados con las técnicas de tinción de histoquímica enzimática, tanto para NADH-TR como para mATPasa (Latorre, Gil, & Vasquez, 1993) (Sanchez-Collado, 2009), (Dubowitz et al., 1973) (Hebling, Scabora, & Esquisatto, 2009), se hizo necesaria la estandarización para el biomodelo a utilizar, teniendo en cuenta las condiciones de edad y el peso. La exactitud en las concentraciones y los tiempos de incubación fueron determinantes para obtener reacciones adecuadas, en especial en mATPasa, para este caso a pH 4.6. En el protocolo utilizado, debieron modificarse tanto las concentraciones como los tiempos con relación al protocolo de biopsia muscular para muestras humanas, que ya se encuentra estandarizado en el Laboratorio de Histología de la Universidad del Valle. Los reactivos utilizados fueron los mismos, por tanto, los músculos de mamíferos pequeños reaccionan a concentraciones diferentes que los de aquellos de mayor tamaño.

En ambas tinciones de histoquímica enzimática, se encontró que la hidrólisis de ATP y la oxidación de NADH son procesos independientes. La reacción observada en cada tinción no fue igual en las fibras, a pesar de pertenecer al mismo músculo. Por ejemplo, en el músculo sóleo con tinción mATPasa fueron evidentes fibras de contracción rápida desde reperfusión de cero horas y durante el resto de los períodos tanto en una hora como en tres horas de isquemia, las cuales disminuyeron progresivamente hasta alcanzar nuevamente una predominancia de fibras de contracción lenta en el día 32 de reperfusión, evento

que se encuentra en contraposición con lo encontrado en tinción NADH-TR. Este es uno de los aspectos que sería relevante profundizar en un estudio posterior, puesto que se observó que no todas las fibras que se identificaron como oxidativas en NADH-TR, correspondieron a fibras de contracción lenta con mATPasa; es de tener en cuenta, que en la literatura se consideran como el mismo tipo de fibra. La misma característica se observó en las fibras de contracción rápida, donde no todas reaccionaron como glucolíticas en NADH-TR. Estas diferencias en las reacciones enzimáticas podrían explicarse teniendo en cuenta los estudios de Caiozzo et al. 2003, en los que se encuentran diferencias en los polimorfismos de la síntesis de la cadena pesada de miosina (MHC), la cual puede generar cambios en los tipos de fibras y no necesariamente seguirse la secuencia de fibras tipo I, tipo IIA y IIB en la plasticidad del músculo esquelético (Caiozzo et al., 2003). Otros autores, realizaron aproximaciones centrándose en las concentraciones de calcio y su disminución en cada tipo de fibra frente a la función, encontrando valores muy cercanos entre uno y otro tipo de fibra (Calderón, Bolaños, & Caputo, 2010) (Schiaffino & Reggiani, 2011).

En los músculos control del biomodelo Wistar, se evidenció una distribución en el porcentaje de los tipos de fibras en tinción mATPasa, similar a lo descrito por otros autores (Soukup et al., 2002) (tabla 1, anexo 14.1). Los valores fueron bastante aproximados entre sí, aunque las técnicas de medición hubiesen sido diferentes. En el estudio realizado por Soukup et al 2002, se utilizó el conteo celular por recuadros mediante estereología; mientras que en el estudio realizado por Pullen, 1977, se realizó conteo directo de cada tipo de fibra por campo microscópico. En el presente trabajo, se realizó análisis de imágenes por medición de áreas, considerándose un método práctico que permitió una vez se tuvieron estandarizados los parámetros de medición, analizar una elevada cantidad de fotografías en poco tiempo, con una buena exactitud.

10.2. Lesión por perfusión

El compromiso de la microcirculación debido al síndrome de “no reflujo capilar” es una de las causas de lesión por perfusión, la cual conlleva a incrementar la lesión por isquemia, así como alteraciones generadas por estrés oxidativo, infiltración celular e inflamación, según lo descrito en el estudio realizado por Da Silveria et al, en 2004, quienes observaron mediante análisis de imágenes de microcirculación, evidencia de vasoconstricción y disminución de la velocidad de flujo capilar junto con vasodilatación e hiperemia, en algunas estructuras vasculares en los estadios iniciales de la perfusión seguida a cuatro horas de

isquemia inducida mediante oclusión arterial (Da Silveira & Bonneti, 2004). Por otra parte, Ghaly & Marsh en 2010, demostraron que se presenta un aumento en la concentración de neutrófilos, mieloperoxidasas y factores quimiotácticos, en las primeras horas de reperfusión con disminución gradual en los siguientes tres días; la infiltración monocitaria aumenta, así como la actividad oxidativa de los macrófagos (Ghaly & Marsh, 2010). En la presente investigación es probable que algunos de los músculos correspondientes a los grupos experimentales presentaran ausencia de reflujo capilar, aunque no fue posible establecer de manera determinante aquellos que la sufrieron, sin embargo, fueron llamativos los cambios drásticos que se observaron entre algunos periodos de reperfusión con recuperación parcial en el siguiente, como sucede entre E25 y E27 o E35 y E37 (anexo 14.1 numerales 53 y 57; 75 y 79).

Entre las características más relevantes que se presentaron durante la reperfusión, se incluyen las alteraciones en la proporción del área que ocuparon las fibras versus el tejido conectivo y su grupo control; presencia de infiltración linfocitaria en ambos músculos y aumento en el componente no fibrilar en periodos similares de reperfusión; presencia de núcleos centrales en las fibras hasta el día 32, cuya proporción disminuyó gradualmente, lo que evidenció cambios de regeneración incluso en el período más prolongado, mientras que los cambios relacionados con necrosis, infiltración focal parcial o completa, desorganización y vacuolas citoplasmáticas, disminuyeron progresivamente hasta el día 32.

De acuerdo con los resultados, se puede expresar que las lesiones fueron reversibles para ambos músculos, puesto que se observó en las imágenes correspondientes al día 32 de reperfusión, recuperación parcial del patrón histológico normal. El músculo extensor radial largo del carpo toleró bien tres horas de isquemia y los cambios fueron leves en su constitución histológica (Biomodelo E3, anexo 14.1 numeral 9), sin embargo, se encontró la mayor susceptibilidad en las primeras horas de reperfusión (Biomodelo E5, E23 y E25 anexo 14.1 numerales 14, 49 y 53). Así mismo, en los periodos más prolongados de reperfusión, se observó recuperación en ambos músculos, en la que el sóleo presentó una regeneración más inmediata que el extensor radial largo del carpo.

La regeneración celular se evidenció por la presencia de mioblastos y miotubos cuyo origen proviene de las células satélites. Pocos autores han evidenciado mioblastos o miotubos en imágenes histológicas; Armand et al (2011), en su estudio sobre la relación entre la presencia del factor inductor de apoptosis,

inducido por estrés oxidativo y la regeneración celular en el sóleo y el extensor radial largo del carpo en ratones, señalaron en sus preparados histológicos con tinción hematoxilina-eosina, la presencia tanto de mioblastos a las 24 horas y a los tres días después de la lesión mediante inyección de cardiotoxina, así como de miotubos a los cinco días y diez días después de la inyección (Armand et al., 2011).

10.3. Músculos extensor radial largo del carpo y soleo

Ambos músculos, el extensor radial largo del carpo, localizado en las extremidades anteriores y el sóleo en las posteriores, después de la disección, presentaron en la medición del peso variaciones pequeñas que fueron significativas solo en el músculo soleo derecho (tabla 1). Walters et. al., quienes determinaron el peso de los músculos disecados que fueron sometidos a dos y cuatro horas de isquemia, encontraron diferencias significativas solo en aquellos a los que se les aplicó isquemia de cuatro horas. Las variaciones se presentaron debido principalmente al edema muscular observado a los dos días de perfusión, el cual disminuyó hacia el día 14 (Walters et al., 2008).

Los hallazgos del presente estudio, relacionados con los cambios por perfusión, coinciden con los encontrados por autores como Carmo-Araujo, 2007, Ghaly & Mars 2010, y Saltzmann 2013, quienes también sometieron sus biomodelos a periodos cortos y prolongados de perfusión, en los que evidenciaron, cambios histológicos a partir de una hora, siendo este es uno de los períodos más cortos estudiados. Los resultados para los períodos de 16 horas, 24 horas, dos días, cuatro días y ocho días fueron relevantes en la identificación de alteraciones ocurridas entre una y tres horas de isquemia.

La determinación de características de normalidad o alteración a través del reconocimiento de áreas, es una técnica que además de ser práctica, permite hacer énfasis solo en aquellos parámetros que se requieren evaluar. La medición automática o semiautomática de áreas mediante la aplicación de máscaras de color en las regiones de interés, ha sido utilizada por diversos autores en tejidos diferentes al muscular estriado esquelético; por ejemplo, Maldjian, et al, 2003, con su estudio sobre la utilidad de un software de análisis de imágenes de resonancia magnética. De esta manera, se observa la importancia en investigación y en diferentes campos del conocimiento en clínica, la aplicación de las técnicas de análisis de imágenes.

En el músculo extensor radial largo del carpo, las áreas de reperfusión seguidas a isquemia de una hora, fueron inferiores pero cercanas al control; mientras que en los que continúan a isquemia de tres horas, fueron aún más pequeñas en algunos de los períodos de reperfusión. Factores como la atrofia de las fibras musculares y los cambios en la matriz extracelular, son la base para explicar la disminución que se presentó en el área de las fibras.

Purslow, 2010, enfatiza sobre la importancia que el tejido conectivo intramuscular tiene en la nutrición, innervación y estabilidad mecánica de los miocitos durante la contracción; este tejido presenta degradación y remodelación según el estímulo mecánico o de lesión al cual se vea sometido el musculo estriado esquelético, procesos que se pueden considerar como adaptaciones, en este caso a la reperfusión.

En el área de la matriz extracelular intramuscular, se observó en los períodos cortos de reperfusión, medianas superiores a la establecida como normal. El mayor incremento del espacio que ocupó el conectivo se presentó en isquemia de tres horas con reperfusión de dos días y fue aproximadamente siete veces el área determinada en el músculo control. En el día 32, el aumento fue 1.5 veces mayor al control en isquemia de una hora y 1.6 veces mayor en isquemia de tres horas. Este aumento contrastó con la disminución en el área que ocuparon las fibras musculares desde cero horas hasta 32 días de reperfusión, tanto en una hora como en tres horas de isquemia. Los cambios en el conectivo incluyeron la presencia de edema y la infiltración celular, las cuales fueron características importantes a lo largo de la reperfusión, tanto en una hora como tres horas de isquemia, en especial en los períodos cortos de 16 horas, 24 horas, dos días y, prolongados de cuatro y ocho días. Da Silveira & Bonneti, 2004, expresaron que el edema y la infiltración celular en el conectivo, son consecuencias del aumento en la concentración de mediadores inflamatorios, vasodilatación, quimiotaxis e incremento en la migración de neutrófilos y otros leucocitos, que producen colagenasas y generan lesión endotelial. Para tener claros los factores que influyen en los cambios en el área de la matriz extracelular intramuscular, sería importante en posteriores investigaciones, evaluar el comportamiento de la angiogénesis.

Los hallazgos que muestran la recuperación gradual de la matriz extracelular intramuscular se relacionan no sólo con la disminución del edema y la infiltración celular en los períodos prolongados de 16, 24 y 32 días, sino también con la

interacción dinámica y coordinada entre células satélite y los fibroblastos que se encuentran en el tejido conectivo, evento mencionado por Murphy et. al, en 2011, quienes en su estudio evidenciaron en el músculo extensor largo de los dedos de ratones, las diferencias en la expresión de factores de transcripción involucrados en la diferenciación celular y la miogénesis. Así mismo, Sassoli et. al, 2014, en cultivos de células mesenquimales estromales (MSC) evidenciaron la diferenciación miogénica y de fibroblastos esqueléticos que producen los elementos que constituyen la matriz y que pueden generar o no fibrosis por exceso en la síntesis del componente fibrilar; es de aclarar, que no siempre un aumento en la función de los fibroblastos conlleva a fibrosis. Estos aspectos explicarían también la recuperación del área que ocupan las fibras musculares en el día 32 de reperfusión, de un 99% para isquemia de una hora y 94% para isquemia de tres horas.

En el músculo soleo, las medianas correspondientes al área que ocupan las fibras musculares, aumentaron concomitantemente con el área de matriz extracelular. La presencia de edema celular e hipertrofia de las fibras, se consideraron como factores relacionados. El mayor valor de área de fibras musculares se presentó en isquemia de tres horas con reperfusión de cuatro días, que corresponde a un 68% por encima del normal. En los estudios relacionados con capacidad contráctil en el sóleo sometido a isquemia y reperfusión, como el realizado por Walters et al., 2008, demostraron que los músculos oxidativos, conservan su fuerza de contracción en una proporción mayor que los músculos predominantemente glucolíticos; de modo que, el aumento en el área de fibras musculares pudo ser un mecanismo de adaptación que le permitió al músculo mantener su función contráctil. En el día 32, el área que ocuparon las fibras musculares, superó en un 62% el valor normal para isquemia de una hora y en un 36% para isquemia de tres horas. Este resultado demuestra que en el tejido muscular tienen lugar procesos similares a los ya descritos con el músculo extensor, encaminados a alcanzar gradualmente el patrón normal, aun siendo expuesto a un periodo extenso de isquemia como tres horas y superar las lesiones que acarrea la reperfusión.

En el área de matriz extracelular, el mayor valor se presentó en isquemia de una hora con reperfusión de 24 horas, periodo en el que se superó cinco veces el valor normal. La susceptibilidad al edema intersticial fue elevada en los periodos cortos de reperfusión. En el día 32, los valores superaron dos veces el normal para isquemia de una y tres horas. Posiblemente, al hacer el seguimiento en periodos más prolongados se observe la recuperación completa del área que ocupa el

tejido conectivo intramuscular, dado por procesos de miogénesis, diferenciación de fibroblastos del tejido conectivo y reducción del edema a lo largo de la reperfusión, procesos ya explicados con el músculo extensor radial largo del carpo.

La infiltración en el conectivo fue abundante en isquemia de una hora con reperfusión de 24 horas, así como en isquemia de tres horas con reperfusión de 16 horas, 24 horas, dos días ocho días y 16 días; periodos similares a los del músculo extensor radial largo del carpo.

Sobre la predominancia de los tipos de fibras musculares, estudios previos como los realizados por Woitaske, et al, 1998 y Walters, et al, 2008, demostraron que el tipo de fibra influye en los cambios adaptativos de los músculos predominantemente glucolíticos hacia el día 14 de reperfusión. En el presente estudio, en el músculo extensor radial largo del carpo respecto al músculo control, cambió la predominancia de las fibras hacia oxidativa e intermedia; estas áreas aumentaron progresivamente en los períodos prolongados de reperfusión de 16 días, 24 días y 32 días. En las fibras glucolíticas, el menor valor se presentó en isquemia de tres horas con reperfusión de 16 horas, seguido de isquemia de una hora con reperfusión una hora. En el día 32 de reperfusión, el área fue de un 36% del valor normal en isquemia de una hora y un 43% en isquemia de tres horas. Para las fibras de contracción rápida en el último día de reperfusión, el área se redujo a un 77% del valor normal en isquemia de una hora, mientras que en isquemia de tres horas, se redujo a un 59%. En el estudio realizado por Chan et al., en 2004, quienes compararon la respuesta del músculo vasto y del sóleo sometidos a 2 horas de isquemia, hasta seis horas de reperfusión mediante el uso de marcadores inmunohistoquímicos para IgM y C3, evidenciaron depósito de C3 en las fibras de contracción rápida del músculo vasto presentando el 28% aproximadamente de fibras lesionadas en relación con el sóleo, el cual presentó el 17% de fibras alteradas. Durante la reperfusión tienden a lesionarse con más frecuencia las fibras tipo IIB.

Por el contrario, en el músculo sóleo no se presentó un cambio drástico de oxidativo a glucolítico, sin embargo se dio una tendencia hacia fibras intermedias durante la reperfusión. En este caso, la reperfusión afectó en menor medida a este músculo predominantemente oxidativo, tal como lo describieron Woitaske, et al, 1998 y Walters, et al, 2008. En los cambios observados con tinción NADH-

TR, el área de fibras oxidativas en general fue inferior a la medida en el control. La menor área se presentó en isquemia de una hora con reperfusión de dos días y en isquemia de tres horas con reperfusión de cuatro días y 32 días; en los tres casos el valor fue de cero micras. En isquemia de una hora con reperfusión de 32 días, el área fue solo un 21% de la establecida como normal. Para las fibras glucolíticas, las medianas fueron superiores que el control. La mayor proporción se observó en isquemia de una hora con reperfusión de 24 días. A los 32 días, los valores continuaron siendo superiores al normal al igual que las fibras intermedias; de modo que, este resultado podría considerarse evidencia de la adaptación del músculo frente a la isquemia.

Con tinción mATPasa para el sóleo, fue evidente la presencia de fibras de contracción rápida desde el período de cero horas y durante el resto de la reperfusión tanto en una hora como en tres horas de isquemia, las cuales disminuyeron progresivamente hasta alcanzar nuevamente una predominancia de fibras de contracción lenta en el día 32 de reperfusión; estos hallazgos también fueron observados por Walters, et al., en 2008, en el sóleo sometido a cuatro horas de isquemia y 14 día de reperfusión. Los mismos resultados se presentaron en las fibras de contracción intermedia, en el último día de reperfusión estudiado, cuyo valor fue de cero micras. El área de fibras de contracción lenta, fue mayor que en el músculo control, hecho que se encuentra en contraposición con lo encontrado en tinción NADH-TR. Estos resultados permiten sugerir que se requieren otros estudios, puesto que se observó que no todas las fibras que se identificaron como oxidativas en NADH-TR, fueron de contracción lenta en mATPasa. La misma característica se observó en las fibras de contracción rápida, donde no todas reaccionaron como glucolíticas en NADH-TR.

En las fibras musculares se evidenciaron dos tipos de cambios citoplasmáticos, el primero, la falta de homogeneidad en la tinción dado por la alteración del componente miofibrilar, hallazgo que coincide con Woitaske, et al, 1998, quienes mediante microscopía electrónica evidenciaron pérdidas en la línea Z, edema mitocondrial y lesión del retículo sarcoplásmico (Woitaske & McCarter, 1998). El segundo, la presencia de vacuolas dentro del citoplasma.

En el músculo sóleo, la desorganización del citoplasma y la presencia de vacuolas citoplasmáticas fueron evidentes tanto en una hora como en tres horas de isquemia, en mayor proporción que en el extensor radial largo del carpo. Se observaron ambas características hasta el día 32 de reperfusión. Torrejais et al. en 2012, en su estudio sobre denervación unilateral del diafragma, le

denominaron vacuolas intracitoplasmáticas, a las discontinuidades que pueden perforar parcial o totalmente el citoplasma y no permiten determinar el tipo de fibra que está siendo afectada (Torrejais et al., 2012). Por otra parte, Zhang et al. (2009), clasifican estas discontinuidades grandes que perforan completamente el citoplasma y pueden ocupar el espacio que corresponde a la fibra muscular, como un defecto durante la preparación denominado fractura por congelación (Zhang et al., 2009). La fractura por congelación se presentó en varios de los períodos, sin embargo, no se consideró una característica asociada al edema, por cuanto no todas las fibras identificadas como edematizadas presentan discontinuidad completa del citoplasma. En este estudio tanto la fractura por congelación como la presencia de vacuolas, fueron más frecuentes en isquemia de una hora que en tres horas.

En condiciones normales, la posición de los núcleos en la fibra muscular es periférica, debajo de la membrana citoplasmática; al realizar isquemia y reperfusión, como se mencionó en el marco teórico, es probable que su posición cambie; en el estudio realizado por Itoh et al en 2011, en el que sometieron el músculo tibial anterior, con predominancia glucolítica, a una hora de isquemia, se evidenciaron núcleos centrales, los cuales se redujeron considerablemente hasta el día 14 de reperfusión, que correspondió al último estudiado en su investigación (Itoh & Kudoh, 2011). Saclier en 2013 y otros investigadores, utilizan el término *Miofibra regenerada*, para referirse a los miocitos que aún presentan núcleos centrales y que corresponden a los estadios de diferenciación en el tejido muscular estriado esquelético sometido a lesión (Saclier et al., 2013), (Itoh & Kudoh, 2011).

En el presente trabajo, la cantidad de núcleos centrales, fue escasa y se observó con más frecuencia en los periodos prolongados de reperfusión seguidos a tres horas de isquemia, desde ocho días hasta 32 días. En el sóleo no se dio una alteración drástica del patrón histológico normal; se evidenciaron menos mioblastos/miotubos en los campos microscópicos.

La necrosis no fue una característica significativa y se presentó en menor proporción en el sóleo al ser comparado con el extensor radial largo del carpo.

En ambos músculos, son significativos los cambios durante la reperfusión, ya sea seguido a isquemia de una y tres horas, o, al comparar los períodos entre sí, aunque estas diferencias no se dieron en todas las variables. Las hipótesis planteadas en el presente trabajo sobre la significancia en las diferencias que se

presentaron en el tejido muscular estriado esquelético y el tejido conectivo intramuscular del extensor radial largo del carpo y el sóleo, sometido a una y tres horas de isquemia frente a los diferentes periodos de perfusión, fueron aceptadas.

Esta investigación permitió un acercamiento a los cambios que ocurren en el tejido conectivo y una evaluación histológica un poco más detallada del tejido muscular estriado esquelético a lo largo de la perfusión. La continuidad de este estudio se encuentra encaminada a seguir evaluando los cambios durante la perfusión en ambos músculos mediante estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en relación con el cambio en la predominancia de las fibras musculares, angiogénesis, presencia de metaloproteinasas en cada periodo y, los cambios en el tendón durante la isquemia y los diferentes periodos de perfusión.

Finalmente, si se pretendiera extrapolar estos resultados a los procedimientos quirúrgicos y siendo los periodos de 16 horas, 24 horas, dos días, cuatro días y ocho días, los más relevantes tanto en una hora como en tres horas de isquemia, sería recomendable seguimiento mayor hasta por 60 días en postoperatorio o posterior al evento traumático, teniendo en cuenta que en el día 32 aún se observan cambios en relación con el patrón de normalidad.

11. Conclusiones

- 1.** Un estudio detallado de los cambios de lesión o de regeneración que se presentan en un tejido a lo largo del tiempo después de ser sometido a un estímulo nocivo, ya sea inducido o espontáneo, permite determinar el momento en que logra su recuperación completa, los periodos en que se observan las mayores diferencias y los posibles cambios de adaptación, en el caso del tejido muscular estriado esquelético, para conservar de manera eficiente su función de contracción muscular.
- 2.** Es importante en futuras investigaciones, profundizar en las características que cambian en el tejido conectivo a lo largo del tiempo, después de la lesión. Esto permitirá comprender en detalle los procesos de regeneración tisular, que se observan para este caso durante la reperusión; aspectos que podrán ser aplicados en procesos patológicos similares a los revisados en el presente estudio.
- 3.** Un adecuado manejo de los biomodelos permite además del trato digno, una disminución en la mortalidad y una optimización de los recursos, evitando el desperdicio innecesario, sea de la vida del biomodelo o de los insumos utilizados en el procedimiento.

12. Recomendaciones

Se sugiere que los estudios que sigan a esta investigación sean encaminados hacia:

- El cambio en la predominancia de las fibras musculares y las vías involucradas
- El estudio de angiogénesis y vasculogénesis durante la reperfusión.
- La presencia de macrófagos tipo I y II en durante la regeneración de la matriz extracelular intramuscular
- La caracterización de la presencia de metaloproteinasas en cada periodo de reperfusión seguido a una y tres horas de isquemia.
- Los mecanismos de apoptosis y los factores involucrados en el proceso.
- Los cambios en el tendón durante la isquemia y los diferentes períodos de reperfusión.
- Estudiar tiempos de reperfusión más prolongados para determinar el momento en el que se da la recuperación total del músculo hasta un valor cercano o igual al control.

13. Divulgación

- Digital image analysis of striated skeletal muscle tissue injury during reperfusion after induced ischemia. Tenth International Symposium on Medical Information Processing and Analysis. SIPAIM, octubre 14-16 de 2014, Cartagena de Indias. Trabajo aceptado. La publicación se realizará en SPIE Digital Library (Indexada en Scopus).
- Manejo perioperatorio de biomodelos de experimentación durante procedimientos quirúrgicos prolongados. IX Congreso Colombiano de Morfología. Resumen publicado en la Revista Médica de Risaralda. Universidad Tecnológica de Pereira. Volumen 19. Suplemento 2. Página 39 2013.
- Caracterización histoquímica, inmunohistoquímica y morfométrica de músculos esqueléticos sometidos a isquemia y perfusión. *Modalidad Poster con reconocimiento como mejor propuesta de investigación*, VIII Congreso Colombiano de Morfología.
Resumen publicado en “Visiones de la Morfología contemporánea”. Serie: Resúmenes de Investigaciones en las Ciencias Morfológicas. Edición especial. 2012. Asociación Colombiana de Morfología. Universidad de Boyacá. ISBN 958-978-57694-1-0 on-line
- Histoquímica enzimática aplicada al diagnóstico de miopatías. *Modalidad Conferencia*. VII Congreso Colombiano de Morfología. Asociación Colombiana de Morfología. Universidad del Magdalena. Santa Marta. 2011.
- Línea de investigación: tejido muscular estriado esquelético. III simposio de Histología del Eje Cafetero. *Presentación oral*. Universidad Tecnológica de Pereira. 2011.

14. Anexos

14.1 Descripción de imágenes de los biomodelos de los grupos control y experimentales.

Estas microfotografías corresponden a muestras de músculos esqueléticos en cortes transversales, obtenidos de biomodelos rata Wistar adultos, sometidos a tiempos cortos de isquemia inducida y de perfusión prolongados hasta 32 días. Para cada músculo se observan las tinciones en dos páginas. La primera página, contiene las tinciones de histoquímica convencional de **Hematoxilina-Eosina (HE)** en la columna derecha y, **Tricrómica de Gomori modificada (TGM)** en la izquierda; en la segunda página se encuentran las tinciones de histoquímica enzimática para **Nicotinamida adenina dinucleotido tetrazolium reductasa (NADH-TR)** en la columna derecha y **miosina Adenosín trifosfatasa con incubación a pH ácido de 4.6 (mATPasa 4.6)**, en la izquierda.

Parámetros a tener en cuenta al momento de la descripción

1. *Edad del biomodelo*

1.1. Tomada en meses.

2. *Eventualidades durante el procedimiento*

2.1. Cambios en los tiempos establecidos para isquemia y perfusión

2.2. Cambios en el tiempo de fijación

2.3. Defectos de preparación: Presencia de fractura por congelación

3. *Características histológicas de normalidad*

3.1. **Fascículos musculares:**

3.1.1. Determinación de número de fascículos por campo

3.1.2. Organización: Cuando se observa grupos celulares claramente definidos por tejido conectivo.

3.1.3. Distancia entre fascículos: Escasa

3.1.4. Tipo de fibra predominante en el fascículo: Oxidativas, glucolíticas, intermedias.

3.1.5. Características del conectivo: En endomisio: Escaso, fibras colágenas delgadas. Sin infiltrado leucocitario

3.1.6. Perimisio: Aumento en la cantidad de las fibras colágenas, sin infiltrado. Agregación de células inmaduras

3.2. Miocitos

Tamaño

Forma de las fibras: Hexagonal

Localización de sus núcleos: Periférico

Distancia entre las fibras: Se determinará por observación como Escasa

Características del citoplasma: Tinción homogénea

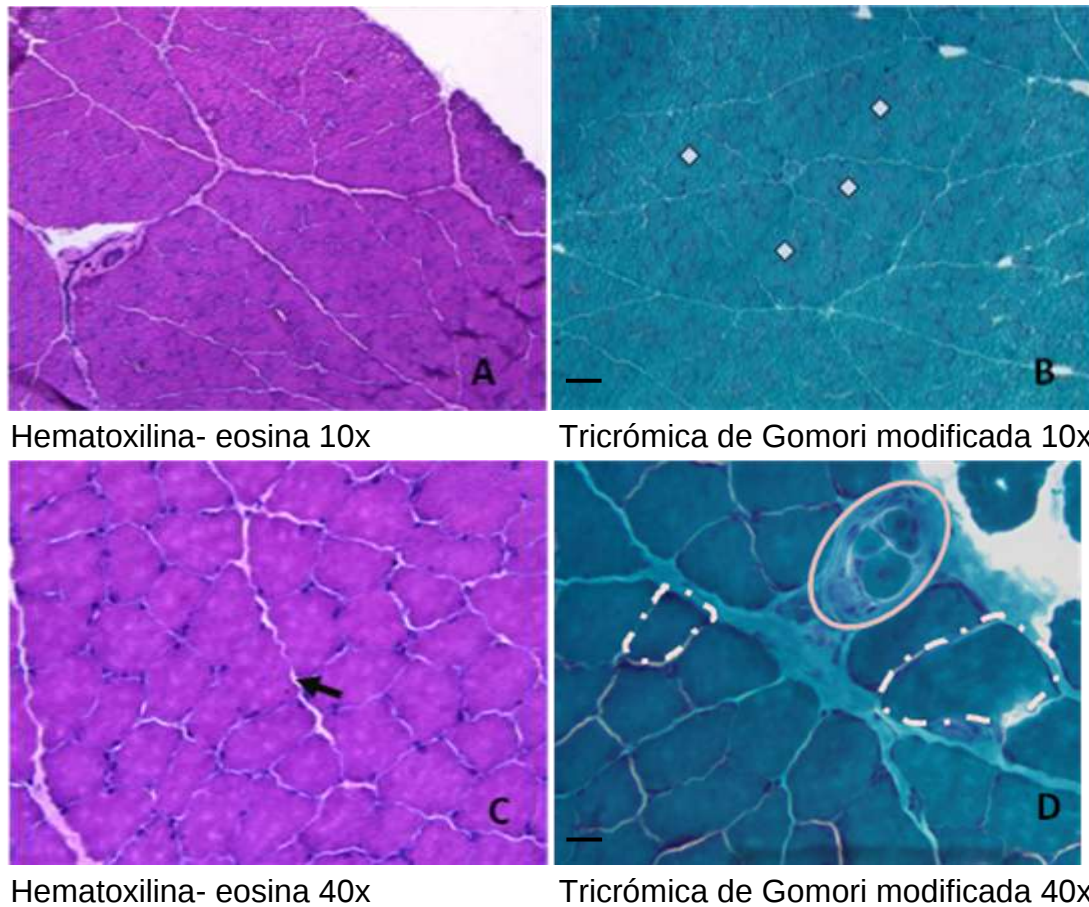
Referencia /Tipo de fibra	Extensor radial longo del carpo (%)			Soleo (%)		
	Fibra tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB	Fibra tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB
(Soukup, Vydra, & Cerný, 1979)	4,5	27,8	35,1	76	25,6	0
(Pullen, 1977)	9,6	51,2	39,3	84	23,7	0
(Soukup et al., 2002)	5,5	18,8	75,5	96,1	*	3,9
Estudio actual (tabla 13)	6,1	53,7	40,3	67,6	32,3	0

Tabla 1. Comparación del predominio en los tipos de fibras por tinción mATPasa en rata Wistar. El estudio del año 2002, fue realizado en biomodelo Sprague Dawley. *Incluido en tipo I.

4. Características histológicas de anormalidad

Miocitos

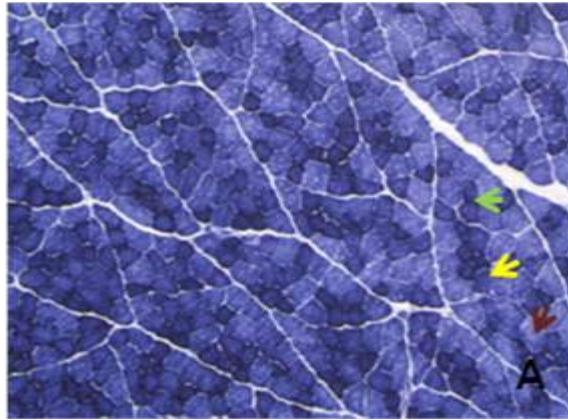
- 4.1. Forma de las fibras: Triangular, circular, Fibras en anillo (bordes oscuros) o en trabéculas (arquitectura anormal en la tinción histoquímica).
- 4.2. Tamaño: Depende del promedio que se defina como normal en el grupo control y se tendrán dos variables: Atrófico y edematizado
- 4.3. Localización de sus núcleos: Central
- 4.4. Distancia entre las fibras: Aumentada
- 4.5. Infiltrado linfocitario en el interior de los miocitos: a) Completo, b) Focal
- 4.6. Necrosis de fibras musculares: cuando se observan fibras pálidas y fragmentadas
- 4.7. Características del citoplasma: a) Mayor intensidad en la coloración del citoplasma, se evaluará como regeneración; b) Patrón moteado, correspondiente a regiones citoplasmáticas claras y oscuras.



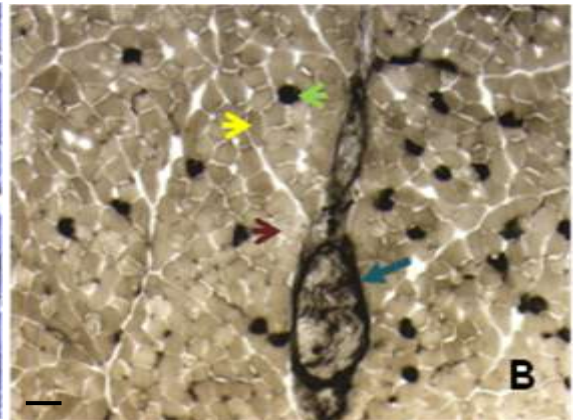
1. Grupo control de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos definidos por perimisio, conformado por tejido conectivo moderadamente denso (rombos). El espacio que ocupa el tejido conectivo entre fascículos es escaso, al igual que entre los miocitos. Bar: 100 micras.

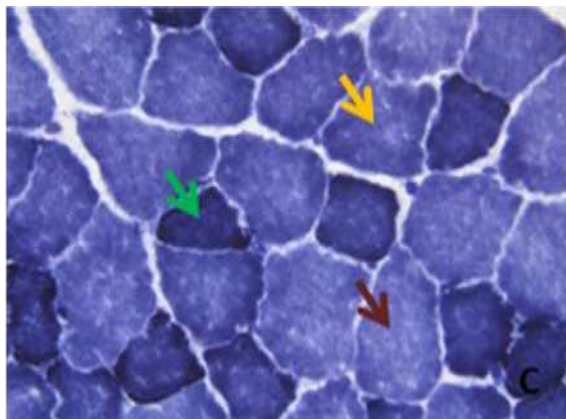
Imagen C. Imagen D. Se aprecian fibras musculares hexagonales, variados tamaños, con múltiples núcleos periféricos. Las líneas punteadas en la imagen D evidencian estas variaciones normales para el biomodelo. Las ondulaciones presentes en los bordes celulares de pocas fibras, son normales para este biomodelo. El endomisio es visible en ambas preparaciones. Detállese el huso muscular (círculo). Bar: 25 micras.



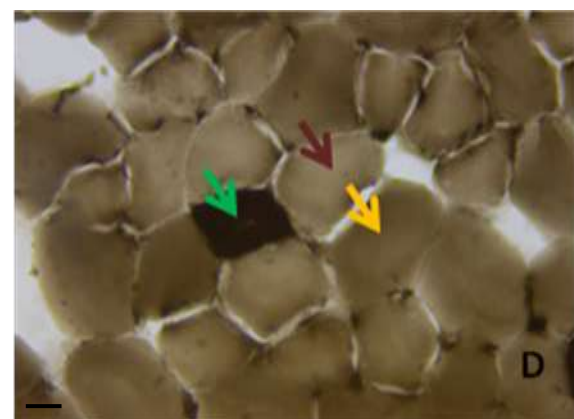
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



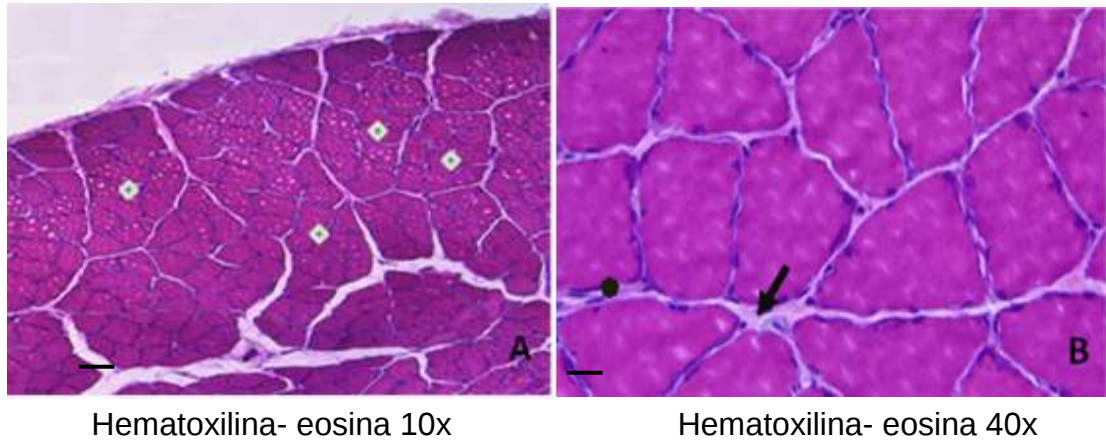
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

2. Grupo control de musculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Se observan fascículos organizados, con tres tipos de fibras presentes; las fibras tipo I, oxidativas o de contracción lenta, presentan una fuerte reacción a la tinción (flecha verde); las fibras tipo IIA o intermedias, presentan menor intensidad en la coloración (flecha amarilla) y, las fibras tipo IIB, glucolíticas o de contracción rápida, presentan tinción clara de su citoplasma (flecha roja). La predominancia que se aprecia en la imagen es de fibras tipo IIA y IIB. Bar: 100 micras.

Imagen B. Se aprecian los tres tipos de fibras descritos en A. Nótese que la predominancia de fibras es igual. Nervio periférico presente en el campo microscópico (flecha azul). Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se observan mayor proporción de fibras tipo IIA (flecha amarilla) y IIB (flecha roja). En relación al tamaño, las fibras tipo IIB se evidencian más grandes que las fibras tipo I. Bar: 25 micras.

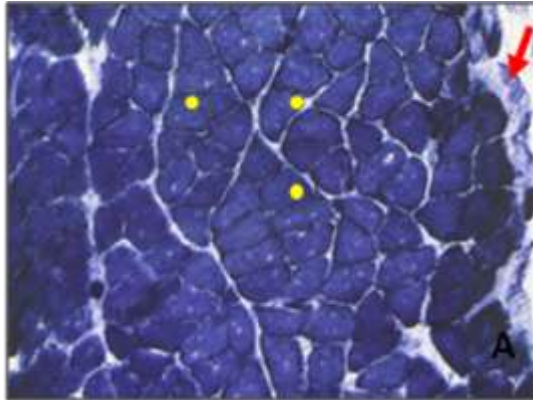


3. Grupo control de músculo sóleo izquierdo

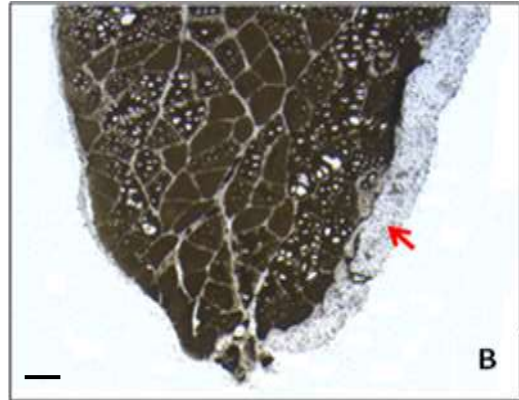
Imagen A. Se aprecian fascículos musculares organizados y delimitados por el perimisio. El espacio que ocupa el tejido conectivo que lo conforma es escaso. Bar: 100 micras.

Imagen B. Se aprecian fibras musculares con forma hexagonal, multinucleadas, tamaños similares y rodeadas por endomisio que ocupa poco espacio entre los miocitos (flecha). Nótese capilarización en el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio (asterisco). Bar: 25 micras.

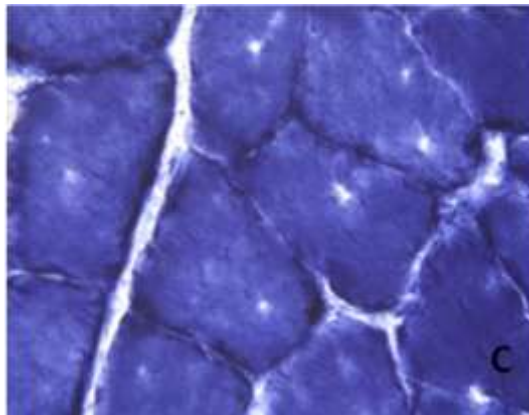
Fractura por congelación moderada.



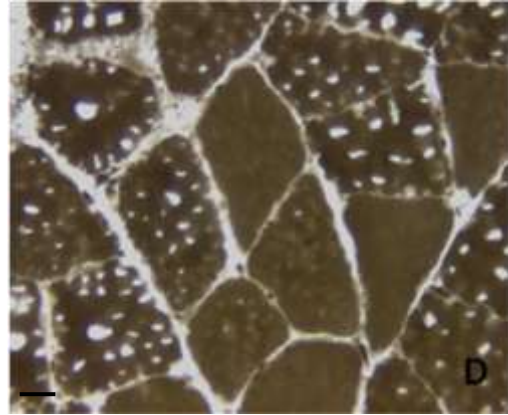
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



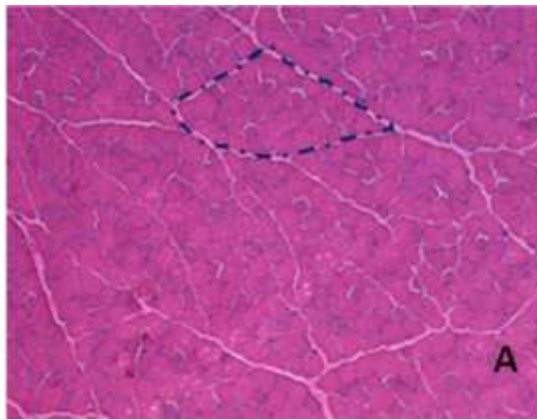
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

4. Grupo control de músculo sóleo izquierdo

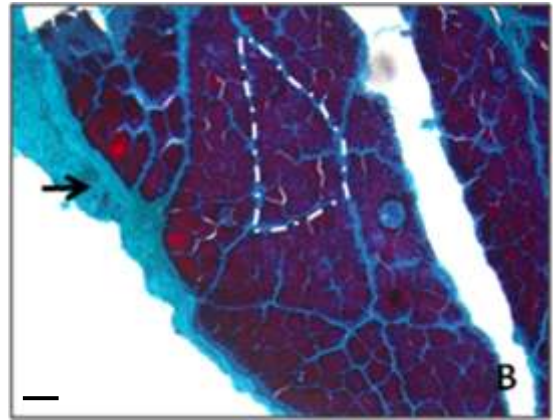
Imagen A. Imagen B. Se observa el epimisio conformado por tejido conectivo denso irregular (flecha roja en ambas imágenes). Los fascículos musculares se encuentran organizados y conformados en su totalidad por fibras tipo I (asteriscos en A). Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Los miocitos oxidativos o tipo I presentan reacción intensa en las dos tinciones. Bar: 25 micras.

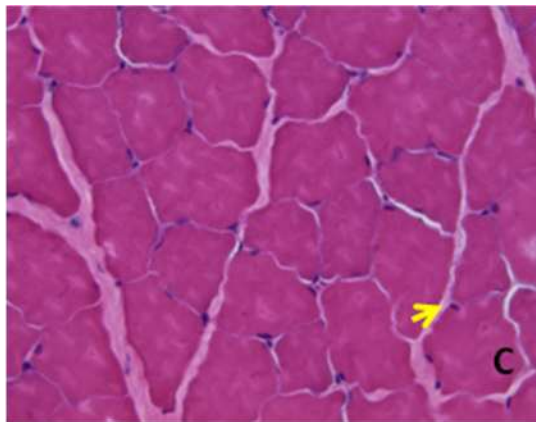
Defectos en la preparación por congelación moderados.



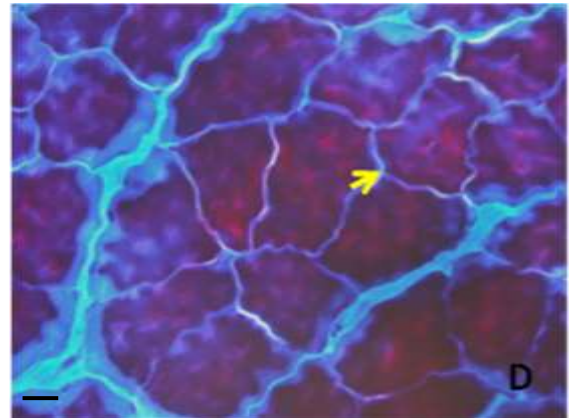
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



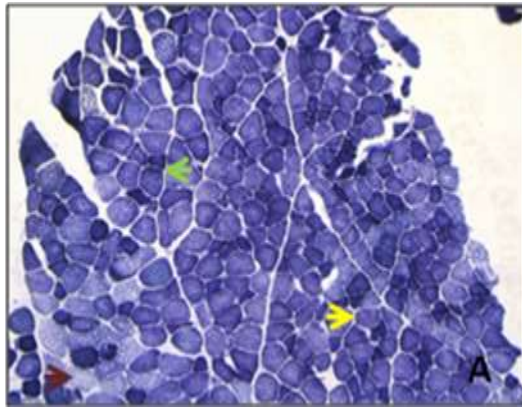
Tricrómica de Gomori modificada 40x

5. Isquemia de una hora sin reperusión (E1) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Nótese fascículos musculares definidos, rodeados por perimysio (línea punteada). El espacio que ocupa el conectivo entre los fascículos es escaso. Bar: 100 micras.

Imagen B. El epimisio constituido por un tejido conectivo denso irregular se proyecta como un conectivo moderadamente denso hacia las fibras musculares, para organizarlas en fascículos musculares (línea punteada). Bar: 100 micras

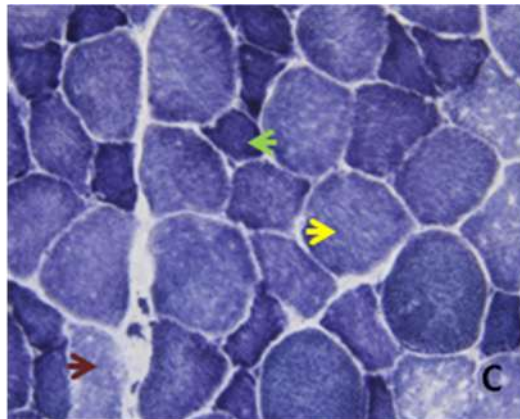
Imagen C. Imagen D. Los miocitos esqueléticos presentan formas hexagonales, ondulaciones en sus bordes celulares, variación en los tamaños y núcleos periféricos. El endomisio se aprecia conformado por tejido conectivo laxo (flechas amarillas). Bar: 25 micras.



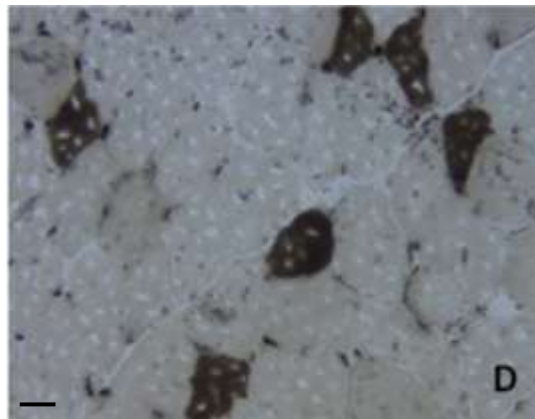
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPase pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



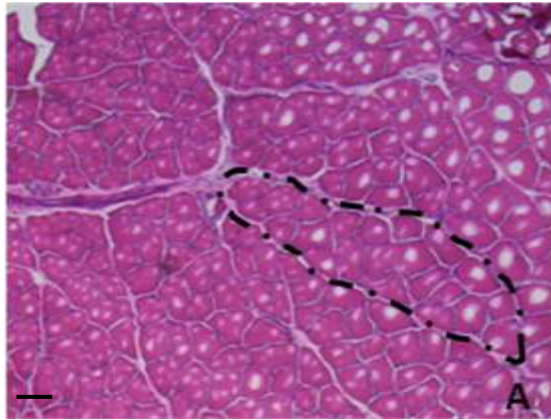
Tinción mATPase pH 4.6 40x

6. Isquemia de una hora sin perfusión (E1) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

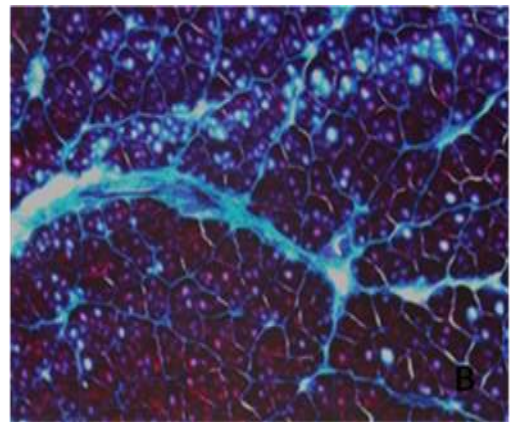
Imagen A. Imagen B. Se evidencian los tres tipos de fibras musculares, tipo I, oxidativas o de contracción lenta (flecha verde), tipo IIA o de contracción intermedia (flecha amarilla) y fibras tipo IIB, glucolíticas o de contracción rápida (flecha roja). La predominancia es de fibras tipo IIA y IIB. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se observan escasas fibras oxidativas con tamaño menor en relación con las demás (flecha verde en C). Las fibras tipo IIA y IIB presentan mayor tamaño (flechas amarilla y roja en C). Bar: 25 micras.

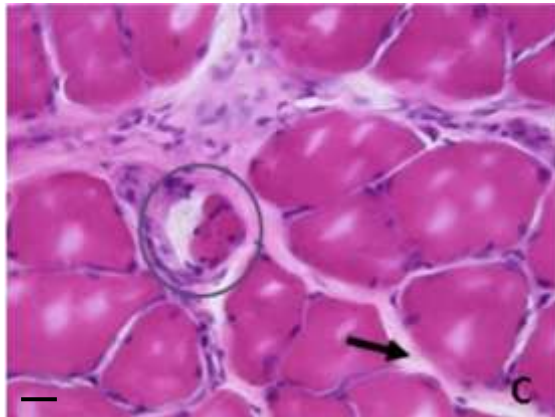
Fractura por congelación moderada.



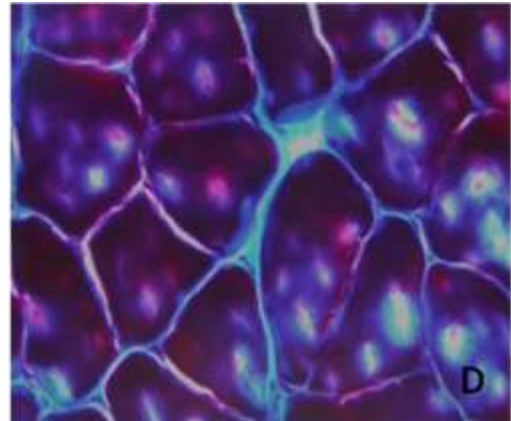
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



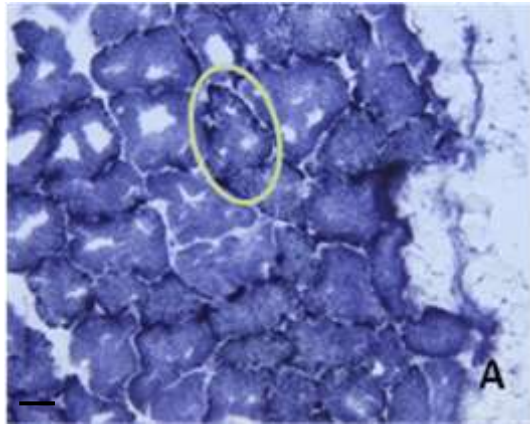
Tricrómica de Gomori modificada 40x

7. Isquemia de una hora sin reperusión (E1) de músculo sóleo izquierdo

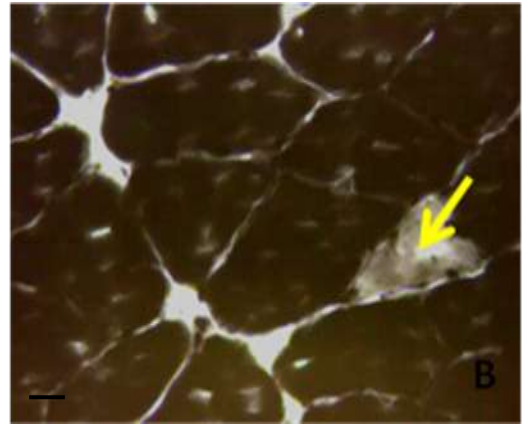
Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados (línea punteada en A); el espacio que ocupa el perimisio se encuentra aumentado y evidencia infiltración celular leve en el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Los miocitos se observan redondeados, con variación en sus tamaños y núcleos periféricos. El endomisio, conformado por tejido conectivo laxo, muestra un leve aumento (flecha en A). Detállese el huso muscular (círculo en C). Bar: 25 micras.

Fractura por congelación moderada.



Tinción NADH-TR 40x



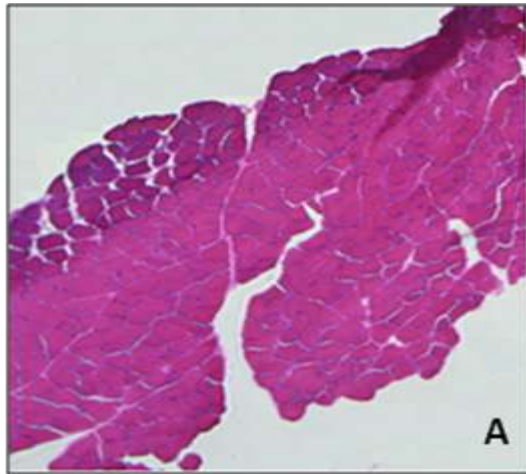
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

8. Isquemia de una hora sin perfusión (E1) de músculo sóleo izquierdo

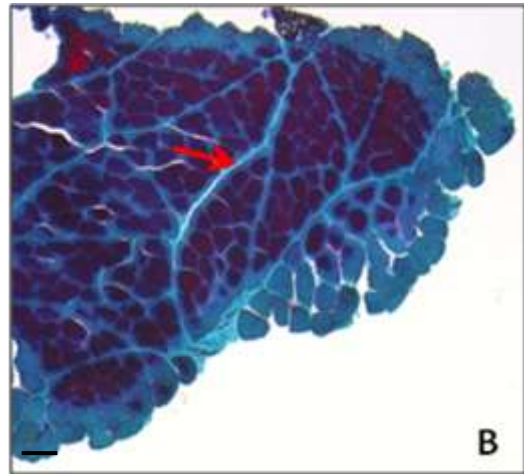
Imagen A. Presenta fibras con predominancia oxidativa o tipo I. En algunas de ellas se identifica un patrón de bordes con mayor reacción a la tinción (círculo). Bar: 25 micras.

Imagen B. La predominancia que se observa es tipo I o de contracción lenta. Nótese una fibra tipo IIB o de contracción rápida (flecha). Bar: 25 micras.

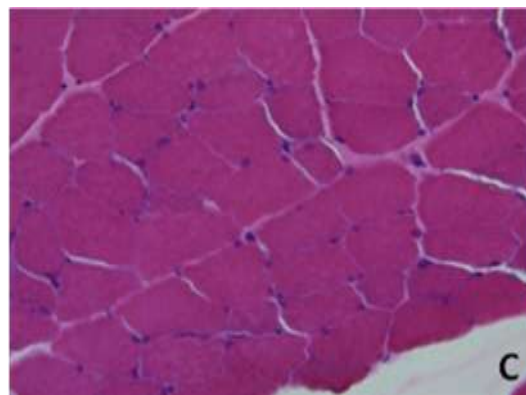
Fractura por congelación moderada.



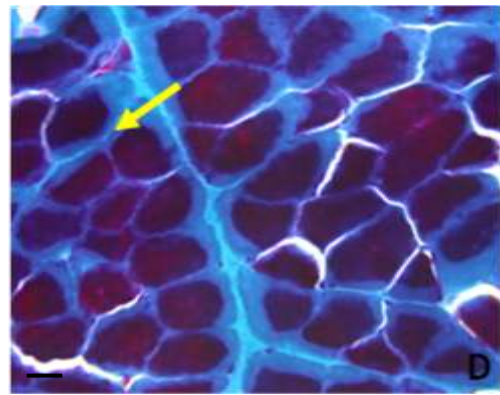
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

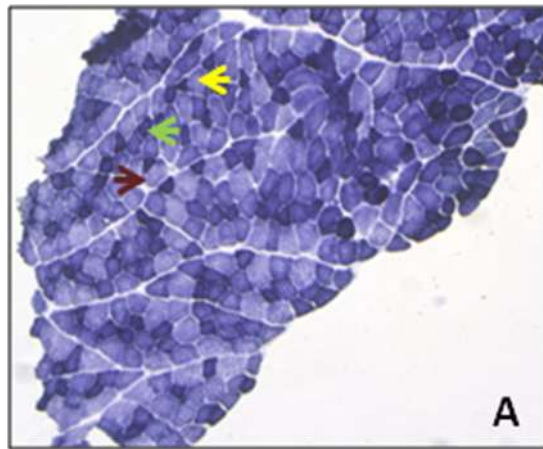


Tricrómica de Gomori modificada 40x

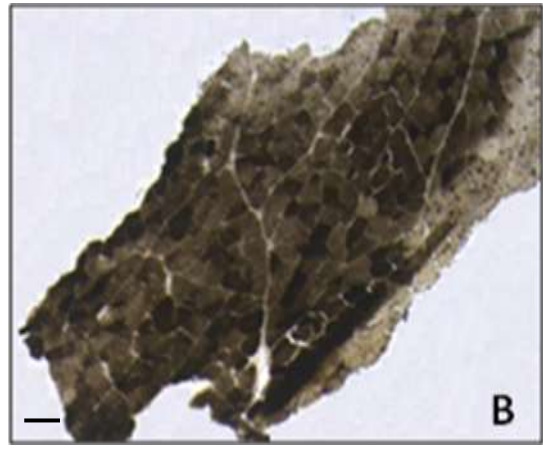
9. Isquemia de tres horas sin reperusión (E3) de músculo extensor radial largo del carpo

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares bien delimitados por el perimisio (flecha en B). Nótese un leve aumento en el espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma. Bar: 100 micras.

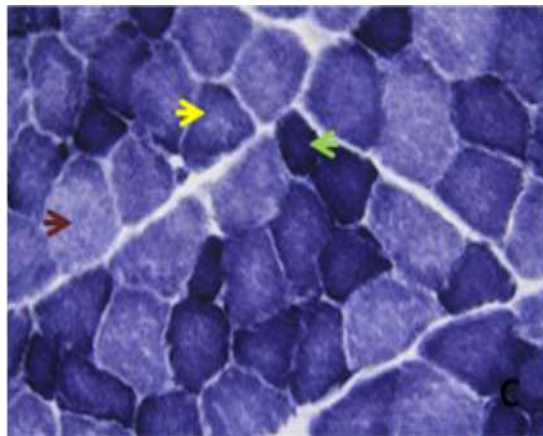
Imagen C. Imagen D. Las fibras musculares presentan formas hexagonales y redondeadas, tamaños variables y núcleos de localización periférica; a su alrededor se observa el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio (flecha en D). Bar: 25 micras.



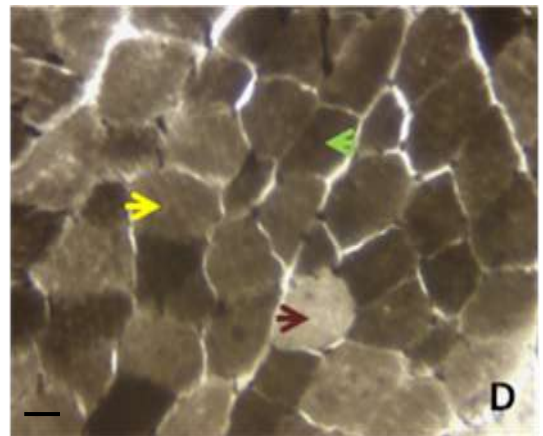
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

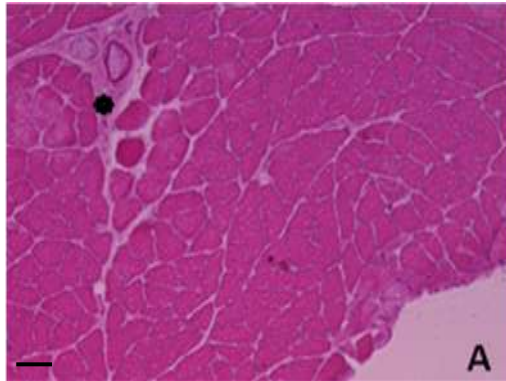


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

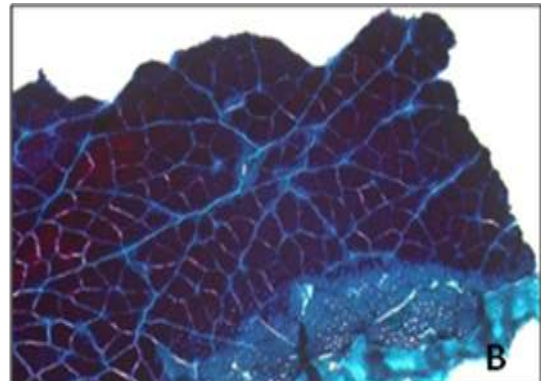
10. Isquemia de tres horas sin perfusión (E3) de músculo extensor radial largo del carpo

Imagen A. Se observan fascículos musculares organizados y conformados por tres tipos de fibras musculares, aunque la predominancia que presenta es de fibras de contracción intermedia y rápida. La flecha verde indica una fibra de contracción lenta, oxidativa o tipo I; en amarillo, fibra de contracción intermedia o tipo IIA y, en rojo, una fibra glucolítica, de contracción rápida o tipo IIB. Bar: 100 micras. **Imagen B.** Aplican los mismos criterios descritos en la imagen A. Se observa que hay mayor reacción de fibras tipo I y tipo IIA. Las fibras tipo IIB son escasas. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Las fibras tipo I se evidencian oscuras (flecha verde) por mayor reacción en la tinción; las tipos IIA y las IIB presentan tonos claros (flechas roja y amarilla). Se observa en D más fibras de contracción lenta e intermedia que de contracción rápida. Bar: 25 micras.



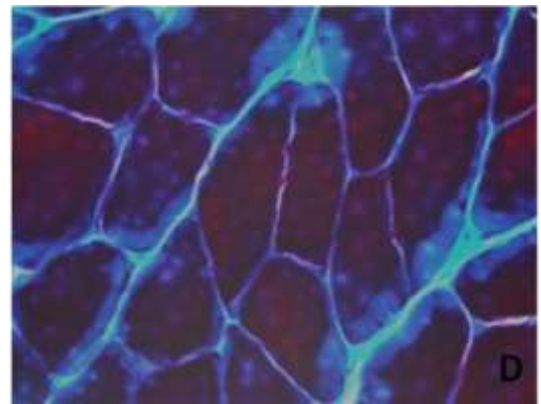
Hematoxilina-eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

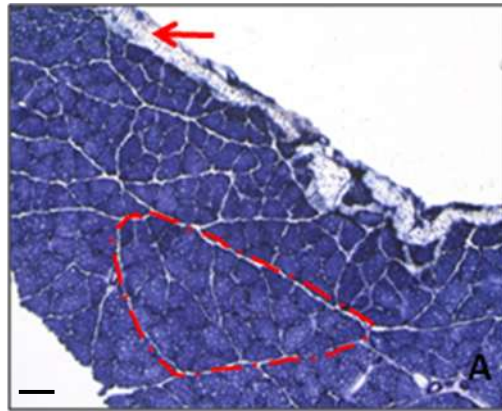


Tricrómica de Gomori modificada 40x

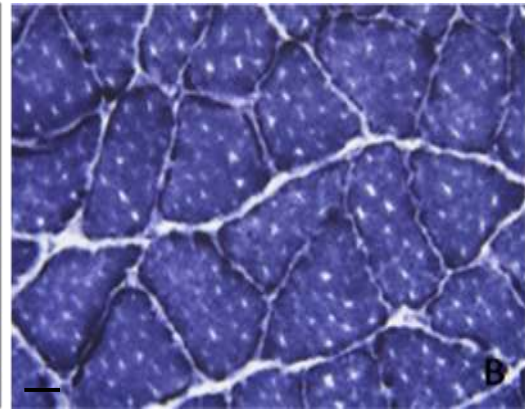
11. Isquemia de tres horas sin reperusión (E3) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se aprecian fascículos musculares bien delimitados por el perimysio, con aumento en el espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma (asterisco en A). Bar: 100 micras.

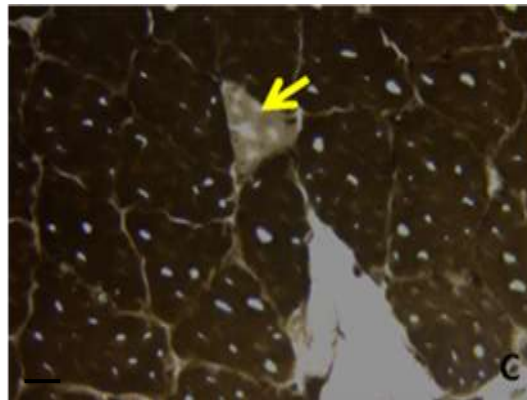
Imagen C. Imagen D. Los miocitos esqueléticos presentan formas hexagonales, poca variación en sus tamaños y núcleos localizados periféricamente. Se observa aumento en el espacio que ocupa el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio. Nótese la presencia de capilares en el conectivo (flecha en C) y el huso muscular asociado a un nervio periférico (círculo en C). Bar: 25 micras.



Tinción NADH-TR 10x



Tinción NADH-TR 40x



Tinción mATPasa pH 4.6 40x

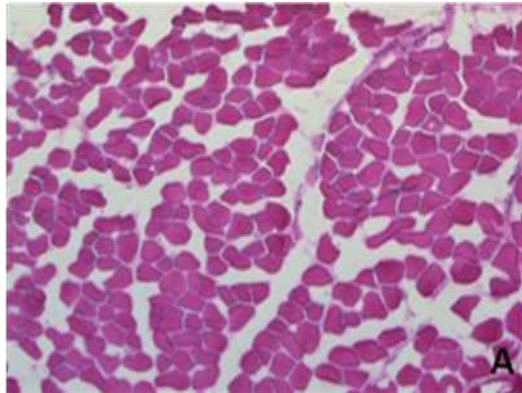
12. Isquemia de tres horas sin perfusión (E3) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Se observa el epimisio conformado por tejido conectivo denso irregular (flecha), que se proyecta hacia las fibras musculares y permite la organización en fascículos musculares definidos (línea punteada). La predominancia en la tinción, es de fibras oxidativas (tipo I). Bar: 100 micras.

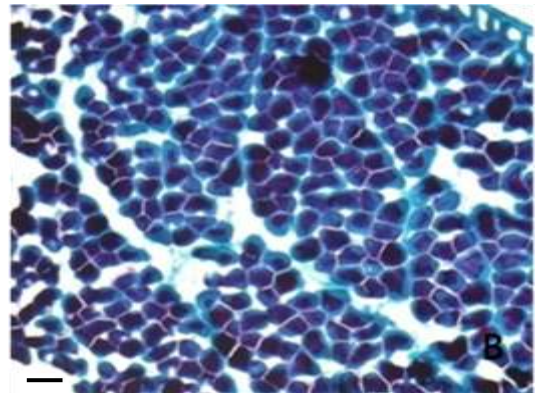
Imagen B. Se observan miocitos esqueléticos con formas hexagonales y tamaños uniformes, que presentan reacción oxidativa en la tinción. Bar: 25 micras.

Imagen C. Detállese la presencia de una fibra de contracción rápida o tipo IIB en medio de fibras de contracción lenta o tipo I (flecha). Bar: 25 micras.

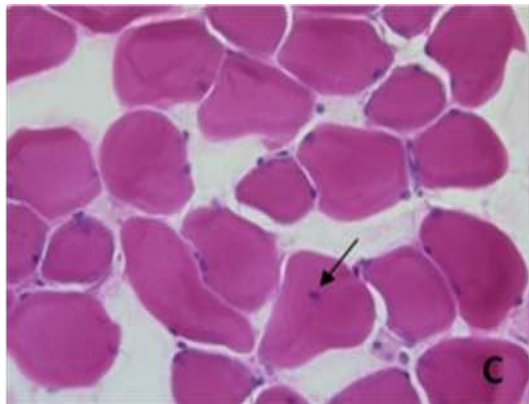
Fractura por congelación moderada.



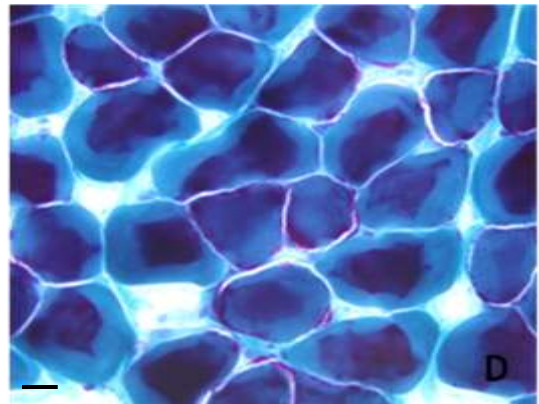
Hematoxilina-eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina-eosina 40x

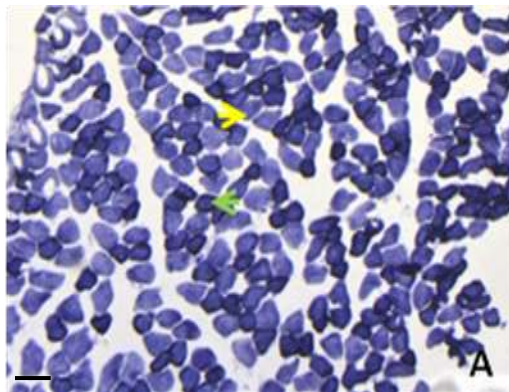


Tricrómica de Gomori modificada 40x

13. Isquemia de una hora con reperfusion de una hora (E5) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observa desorganización de los fascículos musculares con aumento de los espacios que ocupa el tejido conectivo. La tinción en la imagen B evidencia escaso componente fibrilar de la matriz extracelular. Bar: 100 micras.

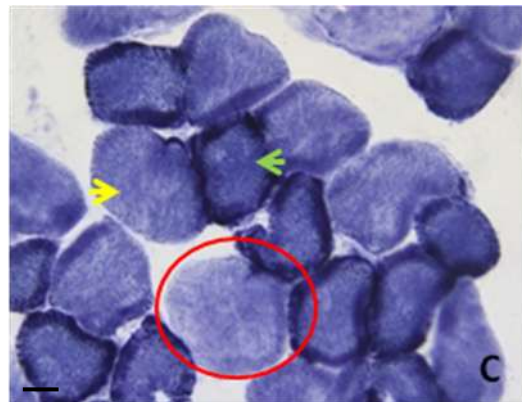
Imagen C. Imagen D. Los miocitos presentan formas redondeadas, diferencias notorias en sus tamaños, núcleos periféricos y aumento en los espacios ocupados por el endomisio. Se observa invasión celular focal en una de las fibras, dado por la presencia de un núcleo redondeado, grande, basófilo claro, localizado en el citoplasma (flecha en C). La infiltración celular en el tejido conectivo es escasa. Se observa disminución del componente fibrilar de la matriz extracelular. Bar: 25 micras.



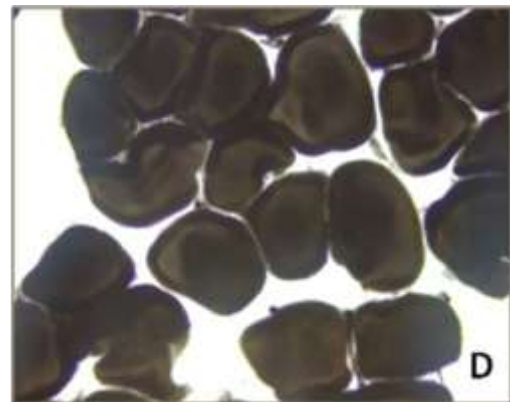
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPase pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



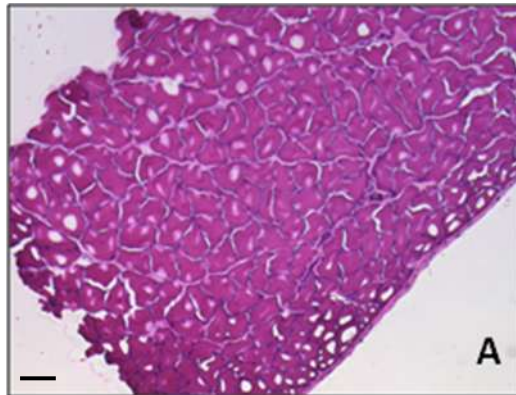
Tinción mATPase pH 4.6 40x

14. Isquemia de una hora con perfusión de una hora (E5) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

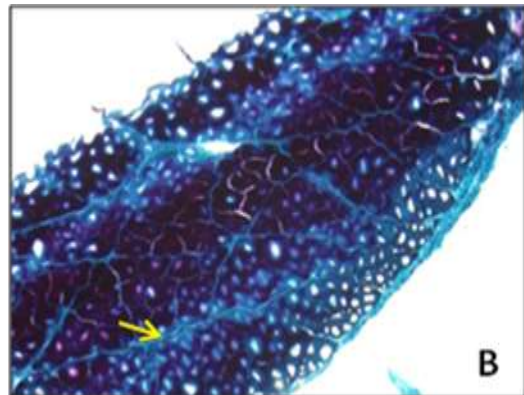
Imagen A. Se observa predominancia de fibras tipo IIA o intermedias (flecha amarilla), siendo escasas las fibras tipo I u oxidativas (flecha verde). Bar: 100 micras.

Imagen B. Se observan fibras tipo I o de contracción lenta en la totalidad de la imagen. Bar: 100 micras.

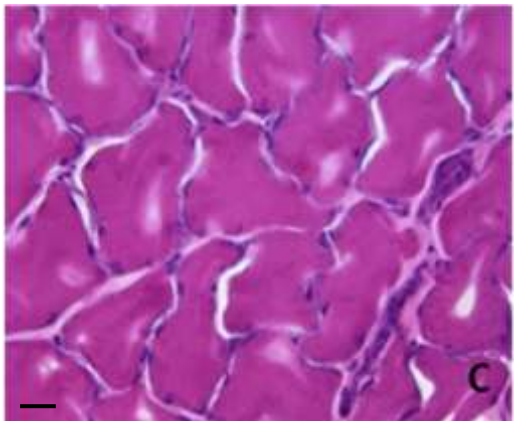
Imagen C. Imagen D. Nótese una fibra muscular tipo IIB o de contracción rápida (círculo en C). En ambas tinciones se observan bordes más oscuros a manera de anillo en torno a cada fibra muscular oxidativa. Bar: 25 micras.



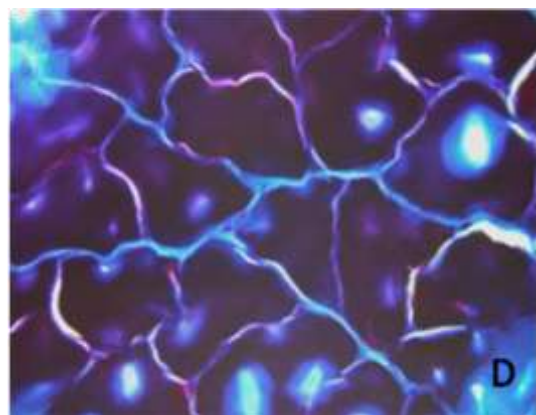
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



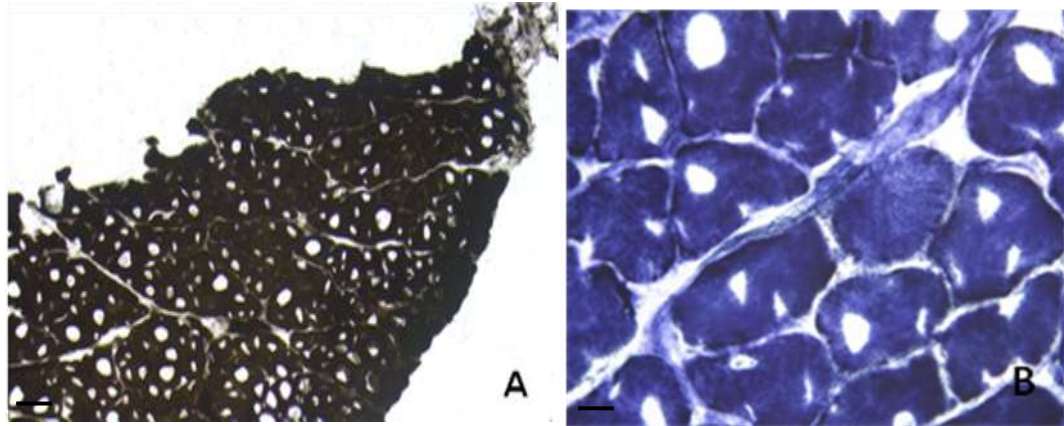
Tricrómica de Gomori modificada 40x

15. Isquemia de una hora con perfusión de una hora (E5) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Los fascículos musculares se encuentran delimitados por perimisio (flecha en B). El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma se observa levemente aumentado. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se aprecia en los miocitos esqueléticos formas irregulares, aumento en el tamaño, núcleos periféricos e incremento en el espacio que ocupa el endomisio. Bar: 25 micras.

Fractura por congelación moderada.



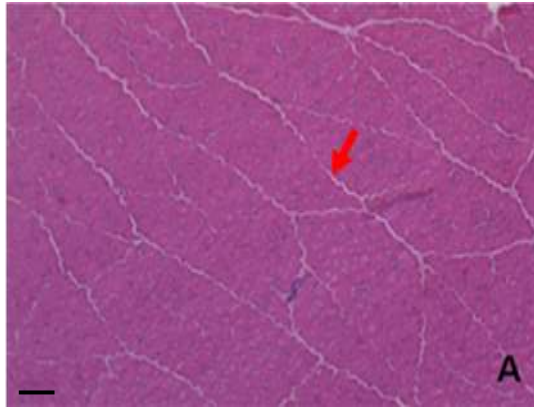
Tinción mATPasa pH 4.6 10x

Tinción NADH-TR 40x

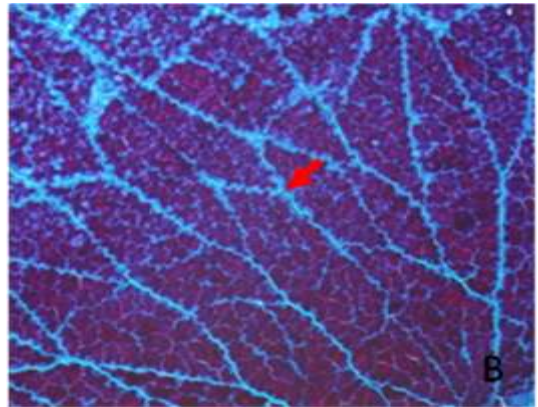
16. Isquemia de una hora con reperfusión de una hora (E5) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observa predominancia de fibras oxidativas, fibras de contracción lenta o miocitos tipo I, los cuales presentan reacción intensa a la tinción.

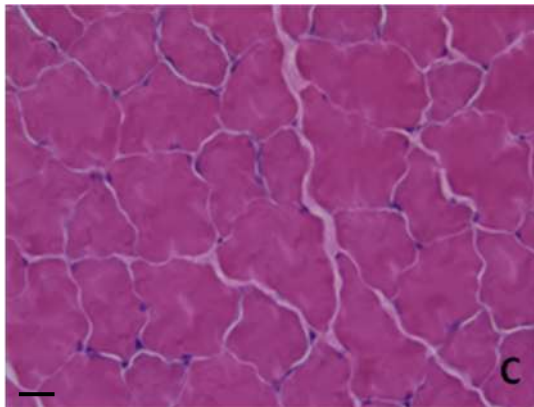
Fractura por congelación moderada. Bar 100 micras. Bar: 25 micras.



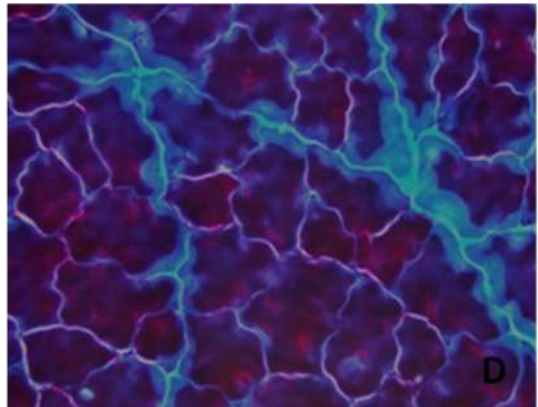
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

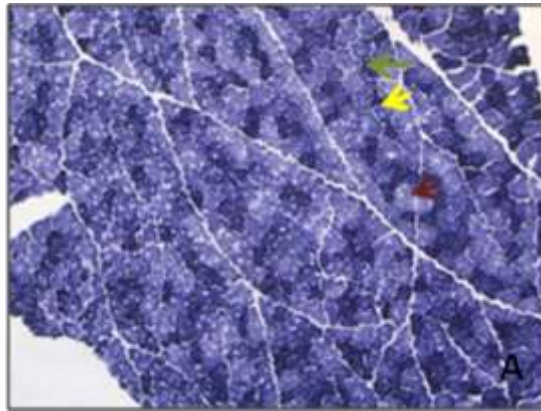


Tricrómica de Gomori modificada 40x

17. Isquemia de una hora con reperusión de 16 horas (E7) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares definidos delimitados por perimisio. El espacio que ocupa el tejido conectivo que lo conforma se encuentra aumentado. Nótese en B, las formas irregulares festoneadas presentes a nivel del perimisio. Bar: 100 micras.

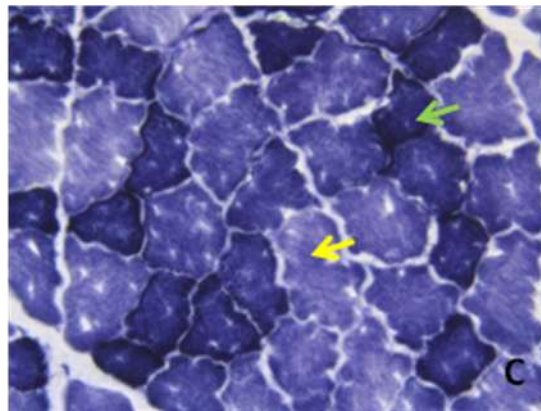
Imagen C. Imagen D. Las fibras presentan cambios en la forma celular, con presencia de bordes celulares irregulares, núcleos periféricos y los espacios que ocupa el tejido conectivo laxo, se encuentran aumentados. La tinción del citoplasma carece de homogeneidad en todos los miocitos, dado por la presencia de regiones acidófilas claras y oscuras que indican desorganización del componente miofibrilar en las células. Bar: 25 micras.



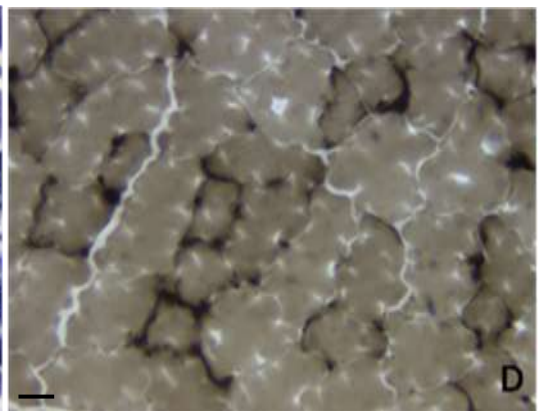
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



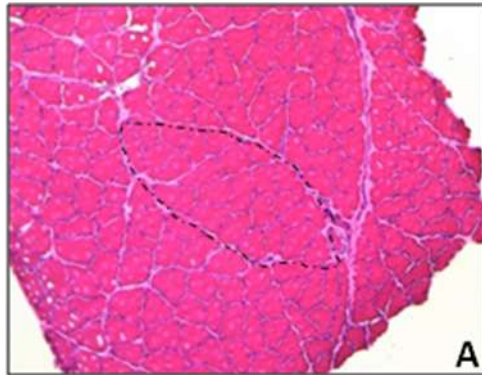
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

18. Isquemia de una hora con perfusión de 16 horas (E7) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

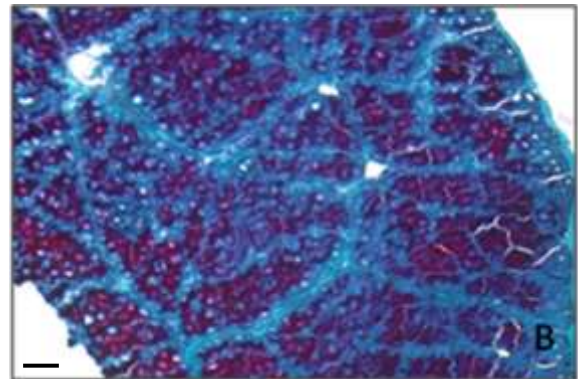
Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados, en los que se identifican los tres tipos de fibras, oxidativas, de contracción lenta o tipo I (flecha verde), de contracción intermedia o tipo IIA (flecha amarilla en A) y glucolítica, de contracción rápida o tipo IIB (flecha roja en B). La predominancia es de fibras intermedias. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Las fibras tipo IIA (flecha amarilla en C) están presentes en mayor cantidad, mientras que las tipo I (flecha verde en C) son escasas. Bar: 25 micras.

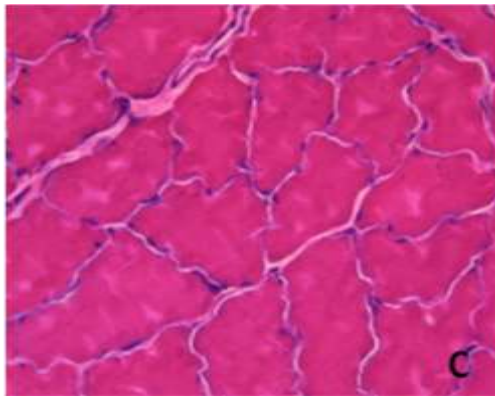
Fractura por congelación moderada.



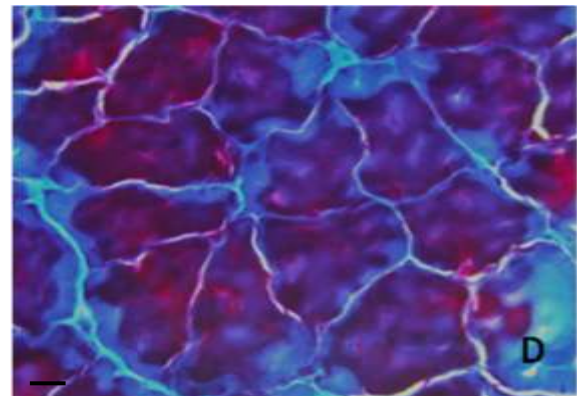
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

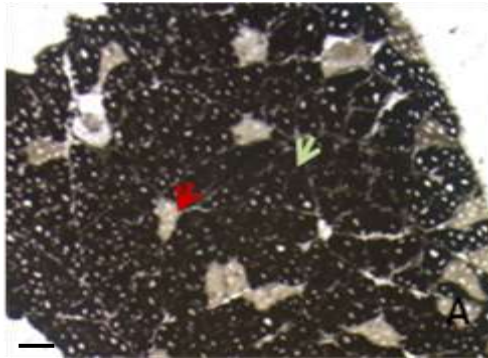


Tricrómica de Gomori modificada 40x

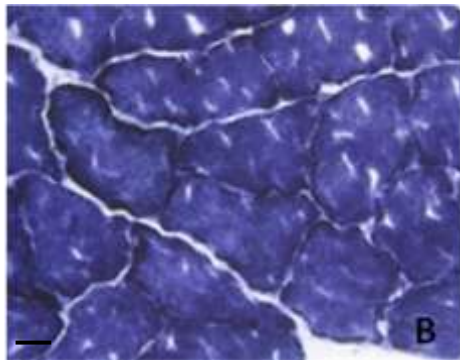
19. Isquemia de una hora con reperusión de 16 horas (E7) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares definidos por tejido conectivo moderadamente denso que conforma el perimisio (línea punteada en A). El espacio que ocupa el conectivo se encuentra levemente aumentado. Bar: 100 micras.

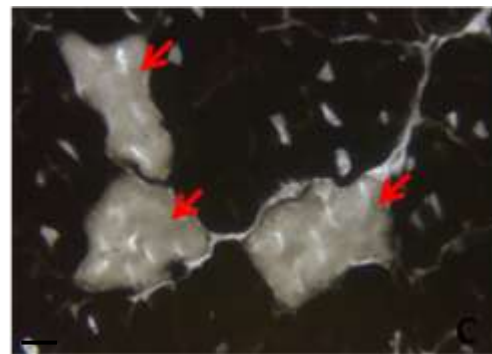
Imagen C. Imagen D. Los miocitos presentan formas hexagonales, con bordes celulares irregulares, variación en sus tamaños y núcleos periféricos. Se encuentran rodeados por el endomisio. Bar: 25 micras.



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



Tinción mATPasa pH 4.6 40x

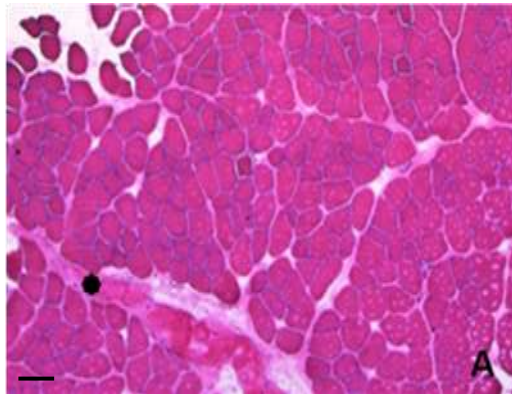
20. Isquemia de una hora con perfusión de 16 horas (E7) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. La predominancia de fibras en la microfotografía es tipo I o de contracción lenta (flecha verde), con presencia de fibras tipo IIA o de contracción rápida (flecha roja). Bar: 100 micras.

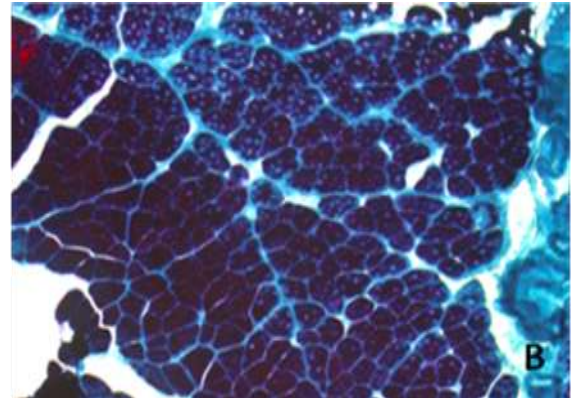
Imagen B. Se observa en la totalidad de la imagen miocitos esqueléticos que reaccionan de manera oxidativa. Bar: 25 micras.

Imagen C. Presenta fibras tipo I en mayor cantidad y tres fibras tipo IIB (flechas rojas).

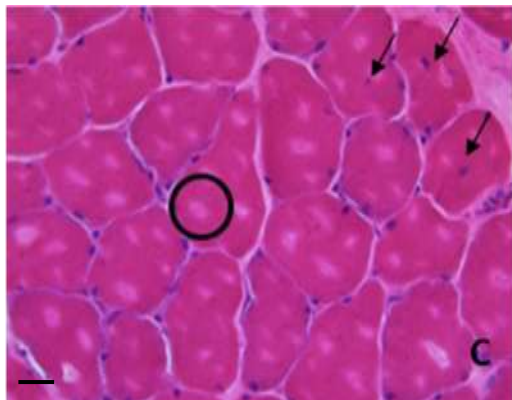
Fractura por congelación moderada. Bar: 25 micras.



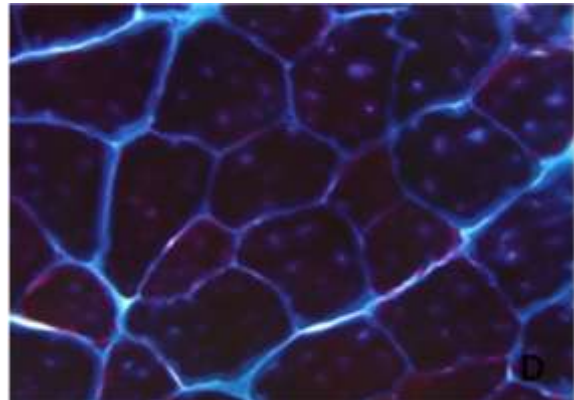
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

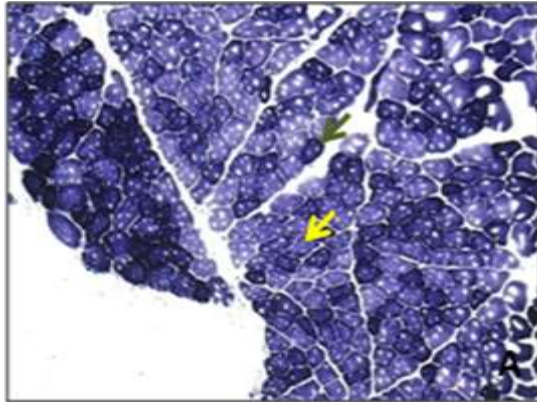


Tricrómica de Gomori modificada 40x

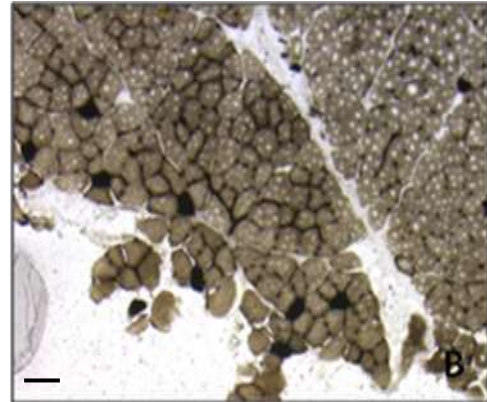
21. Isquemia de una hora con reperusión de 24 horas (E9) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observa desorganización de los fascículos musculares. El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que conforma el perimio se encuentra aumentado. Dilatación de vasos venosos (asterisco en A). La infiltración celular es moderada. Bar: 100 micras.

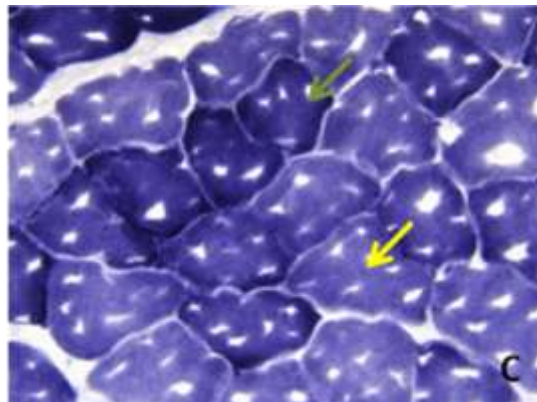
Imagen C. Imagen D. Se aprecian fibras musculares redondeadas, tamaños variables y núcleos localizados periféricamente. La tinción del citoplasma carece de homogeneidad dado por regiones eosinófilas claras que se observan al interior de los miocitos (círculo en C). Presencia de invasión focal en tres fibras evidenciado por la presencia de núcleos fusiformes, basófilos claros y de localización inespecífica dentro de las células (flechas en C). Infiltración celular moderada en el endomisio que rodea a los miocitos. Bar: 25 micras.



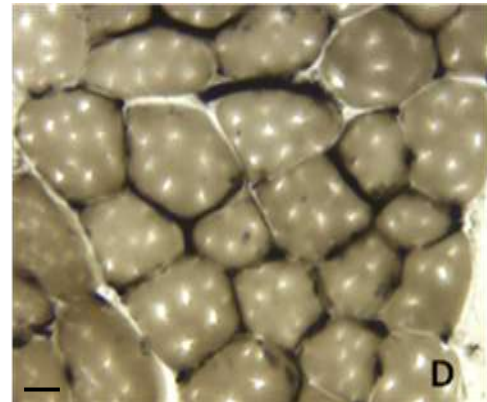
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

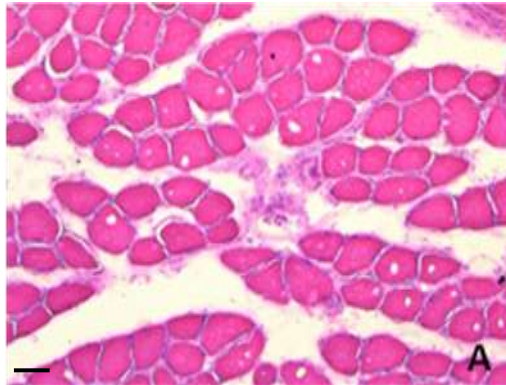


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

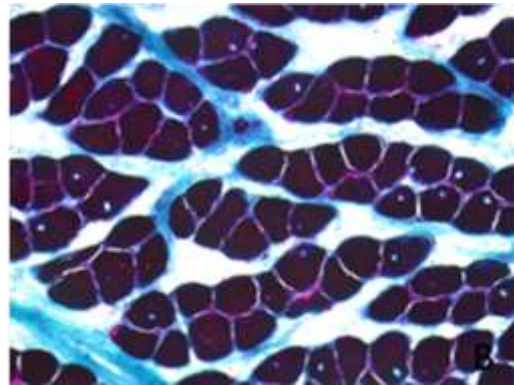
22. Isquemia de una hora con reperusión de 24 horas (E9) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observa desorganización de fascículos musculares, los cuales se encuentran conformados por fibras tipo I u oxidativas (flecha verde en A) y fibras tipo IIA o intermedias (flecha amarilla en A). La predominancia es de fibras intermedias. Bar: 100 micras.

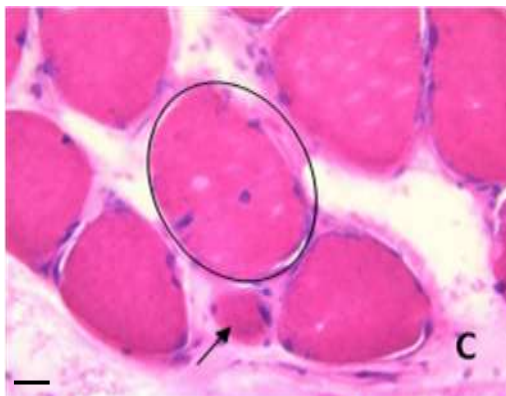
Imagen C. Imagen D. Se evidencia en el campo microscópico fibras tipo I (flecha verde en C) y tipo IIA (flecha amarilla en C). Fractura por congelación moderada. Bar: 25 micras.



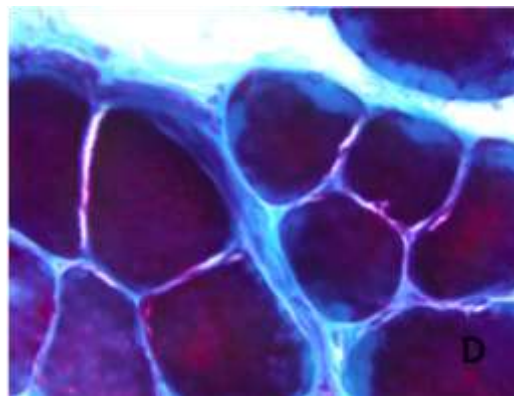
Hematoxilina-eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina-eosina 40x

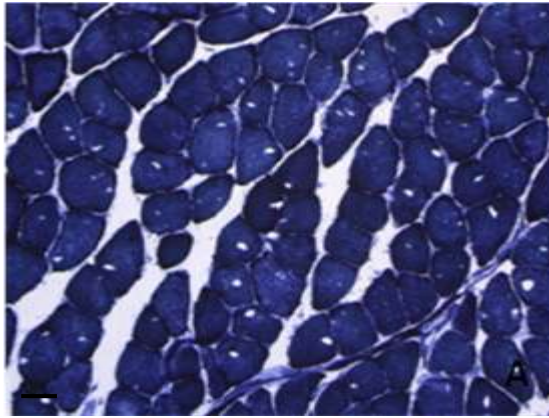


Tricrómica de Gomori modificada 40x

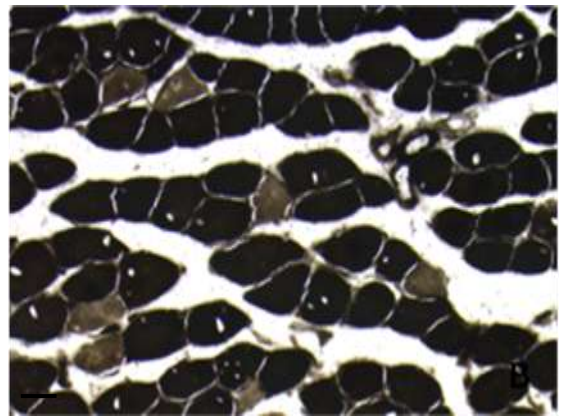
23. Isquemia de una hora con reperusión de 24 horas (E9) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. El espacio que ocupa el perimysio que rodea los fascículos musculares es amplio. El tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma presenta escasos elementos fibrilares de la matriz extracelular. La infiltración celular es moderada. Bar: 100 micras.

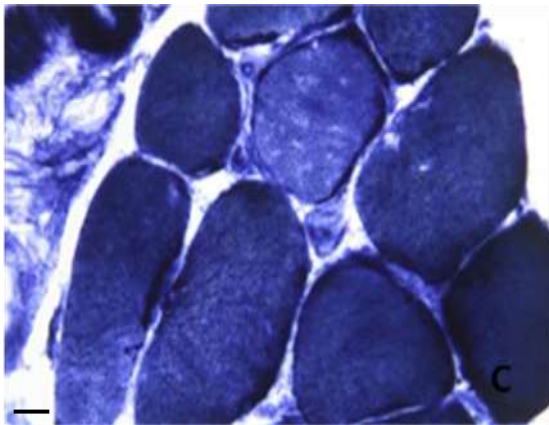
Imagen C. Imagen D. Las fibras presentan aspecto redondeado, marcado edema de algunas, con diferencias en sus tamaños (círculo en C) otras, con atrofia (flecha en C), núcleos periféricos e invasión celular focal. Las fibras de menor tamaño evidencian mayor reacción en la tinción con eosina. La infiltración celular en el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio es moderada. Bar: 25 micras.



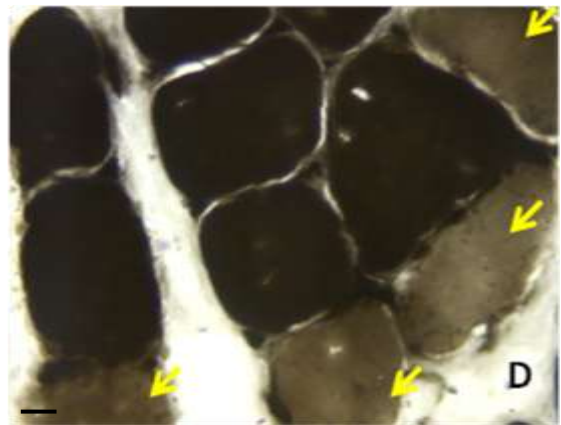
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPase pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



Tinción mATPase pH 4.6 40x

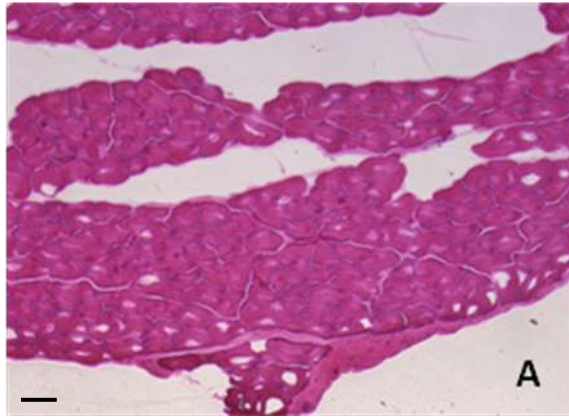
24. Isquemia de una hora con perfusión de 24 horas (E9) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Se observa predominancia oxidativa. Bar: 100 micras.

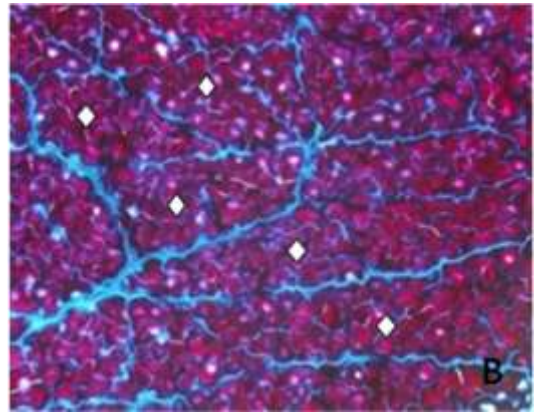
Imagen B. Se aprecia un incremento en la cantidad de fibras tipo IIA. Bar: 100 micras.

Imagen C. Se observan fibras con tamaños variables. Las de mayor tamaño presentan falta de homogeneidad en la tinción del citoplasma, evidenciado por regiones más claras en el interior de los miocitos. Bar: 25 micras.

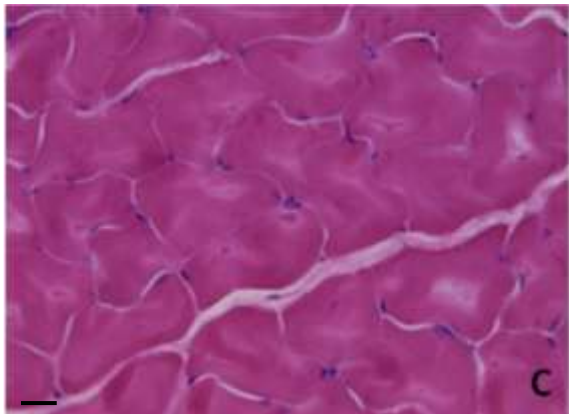
Imagen D. Se aprecian cuatro fibras tipo IIA (flechas amarillas). Bar: 25 micras. Fractura por congelación leve.



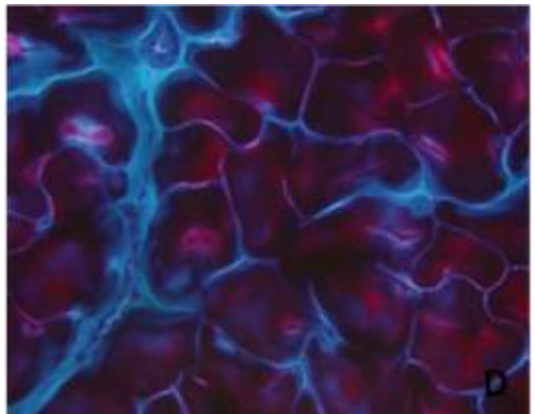
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

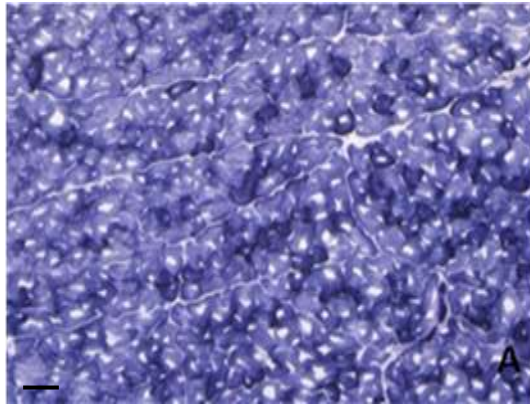


Tricrómica de Gomori modificada 40x

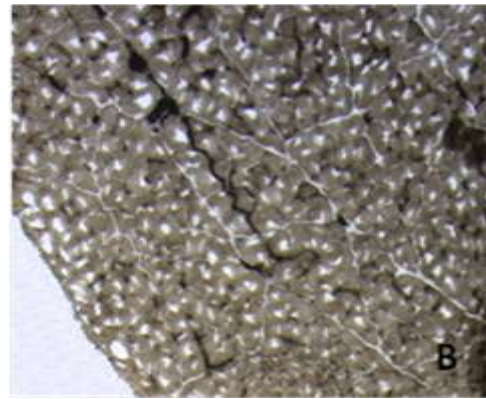
25. Isquemia de una hora con reperfusión de dos días (E11) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares delimitados por perimysio (rombos en B); se evidencian bordes irregulares a manera de festoneado. El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso se encuentra levemente aumentado. Bar: 100 micras.

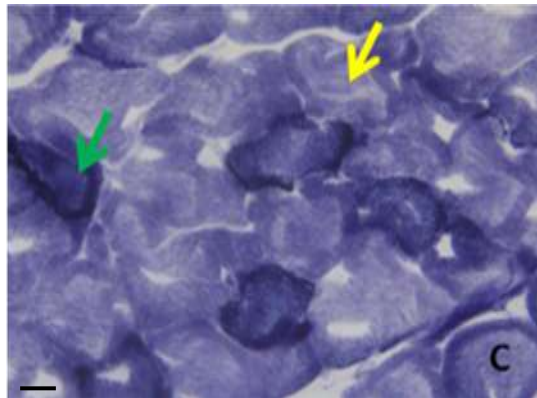
Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos con forma irregular, tamaños variables y núcleos con localización periférica. Se observa escasa homogeneidad en la tinción del citoplasma, evidenciado por regiones con eosinofilia clara y oscura al interior de las fibras. Bar: 25 micras.
Fractura por congelación moderada.



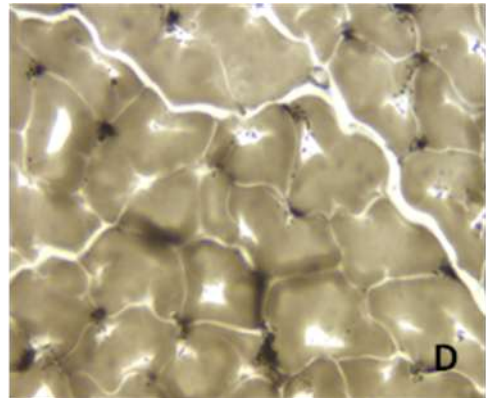
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPase pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



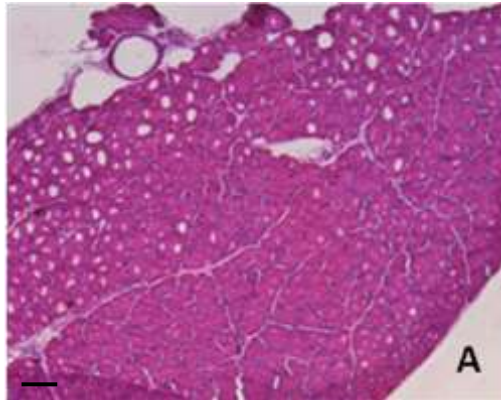
Tinción mATPase pH 4.6 40x

26. Isquemia de una hora con reperusión de dos días (E11) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

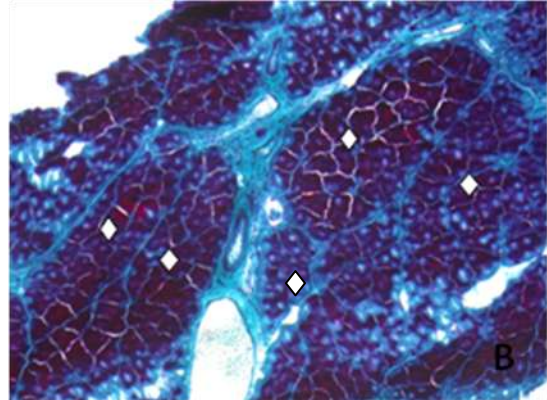
Imagen A. Imagen B. Presencia de fascículos musculares con bordes festoneados y conformados por fibras tipo IIA y escasas fibras tipo I (oxidativas). Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se observan miocitos con formas irregulares y bordes oscuros que sobresalen en las fibras oxidativas (flecha verde en C) y en algunas tipo IIA (flecha amarilla en C). Bar: 25 micras.

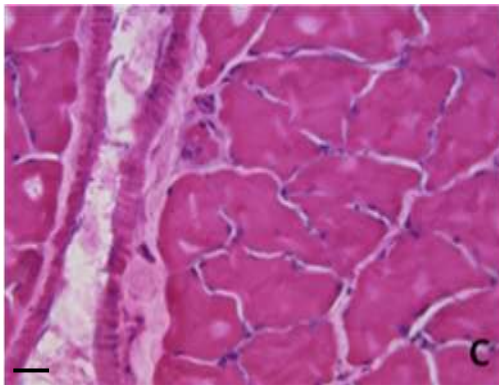
Fractura por congelación moderada.



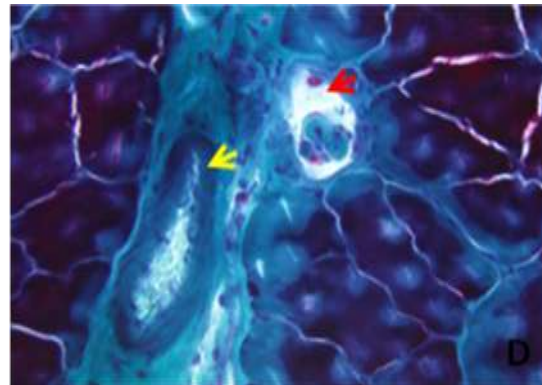
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



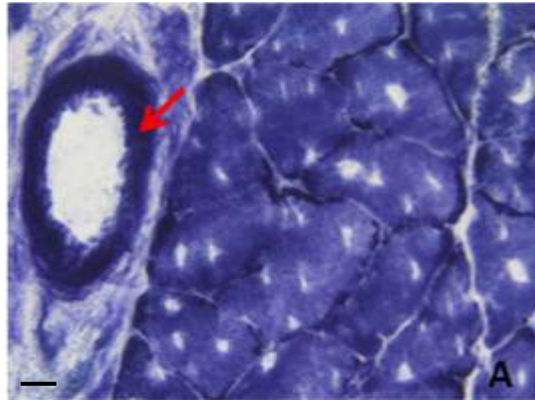
Tricrómica de Gomori modificada 40x

27. Isquemia de una hora con reperfusión de dos días (E11) de músculo sóleo izquierdo

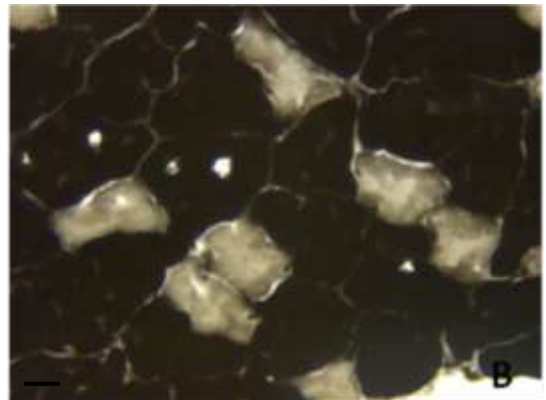
Imagen A. Imagen B. Se observa fascículos musculares delimitados por el conectivo moderadamente denso que conforma el perimysio. Los espacios que ocupa el conectivo se encuentran levemente aumentados. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos con formas hexagonales, tamaños uniformes, núcleos periféricos y relación con el conectivo laxo que conforma el endomisio. Los espacios que ocupa el conectivo se observan levemente aumentados. Nótese una arteria muscular (flecha amarilla en D) acompañada del huso muscular (flecha roja en D). Se identifican al interior del huso muscular fibras intrafusales con núcleos centrales. Bar: 25 micras.

Fractura por congelación moderada.



Tinción NADH-TR 40x



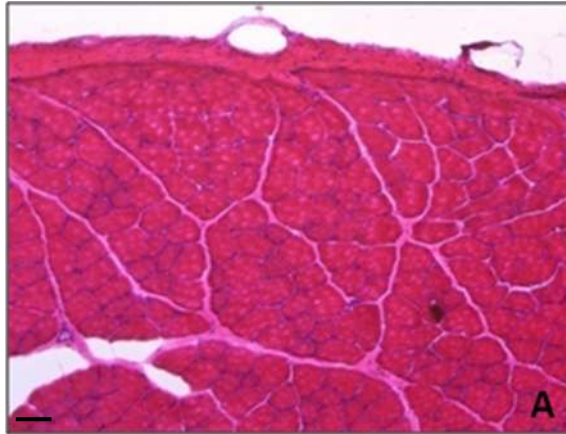
Tinción mATPase pH 4.6 40x

28. Isquemia de una hora con reperfusión de dos días (E11) de músculo sóleo izquierdo

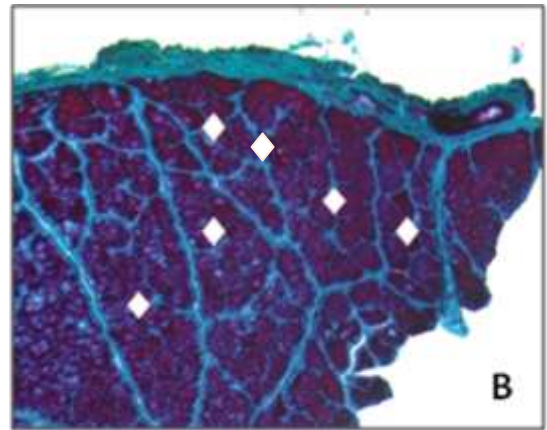
Imagen A. Se aprecia predominancia de fibras oxidativas o tipo I. La túnica media de la arteria muscular presenta reacción intensa a la tinción. Bar: 25 micras.

Imagen B. La predominancia es oxidativa, con presencia de fibras glucolíticas o tipo IIB.

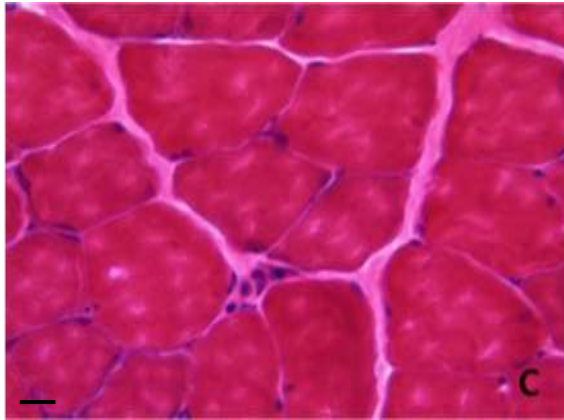
Fractura por congelación moderada. Bar: 25 micras.



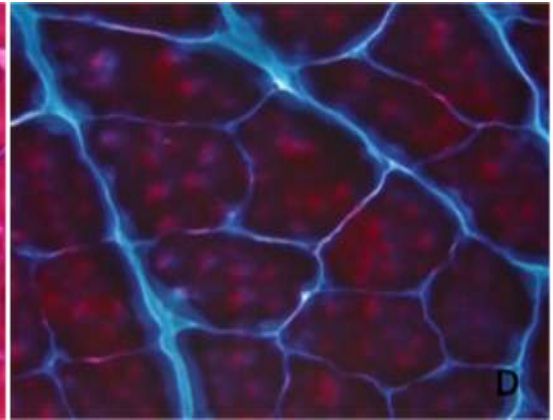
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



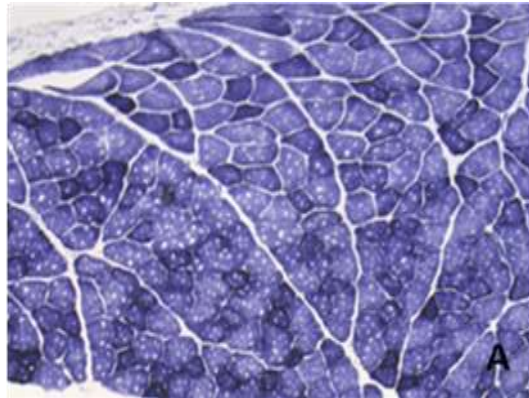
Tricrómica de Gomori modificada 40x

29. Isquemia de una hora con reperusión de cuatro días (E13) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observa el tejido conectivo denso irregular que conforma el epimisio, el cual se proyecta hacia las fibras musculares como un conectivo moderadamente denso, que permite la organización de fascículos musculares delimitados por perimisio (rombos en B). El espacio que ocupa el conectivo se encuentra levemente aumentado. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos hexagonales, con poca variación en sus tamaños, núcleos periféricos y rodeados por tejido conectivo laxo que conforma el endomisio. Bar: 25 micras.

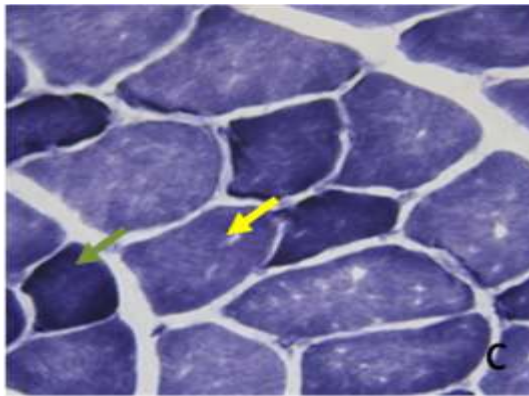
Fractura por congelación leve.



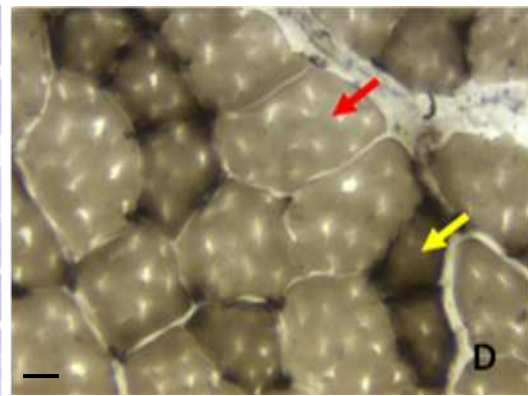
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



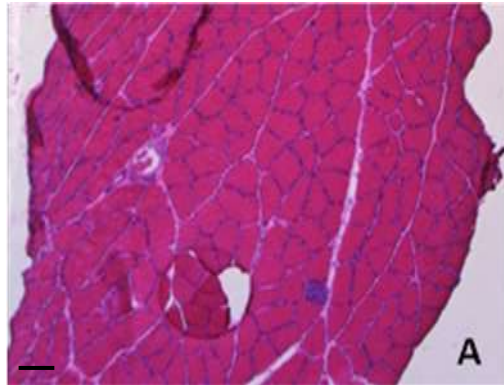
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

30. Isquemia de una hora con perfusión de cuatro días (E13) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

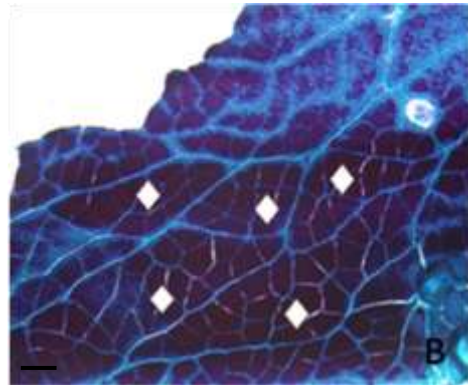
Imagen A. Imagen B. Se observa el epimisio y la organización en fascículos musculares por el perimisio. Cada fascículo muscular evidencia predominancia de fibras tipo IIA o intermedias y escasas fibras tipo I u oxidativas. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se observan miocitos hexagonales, con tamaños variados y dos tipos de reacción en las tinciones. Las fibras oxidativas (tipo I- flecha verde en C) con menor tamaño, las fibras intermedias (IIA - flecha amarilla en C y D) de mayor tamaño y las fibras de contracción rápida (IIB - flecha roja en D), aún más grandes. Bar: 25 micras.

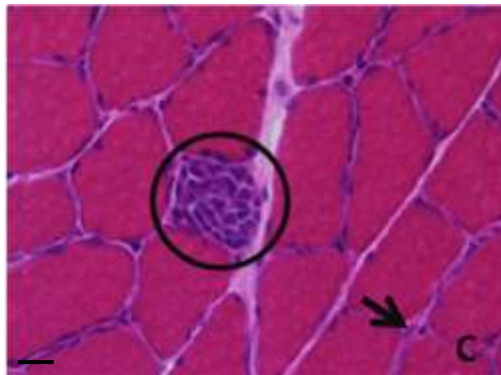
Fractura por congelación leve.



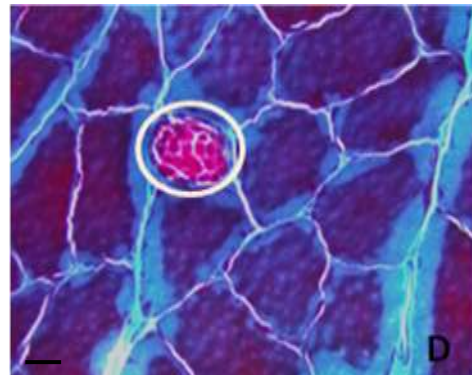
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



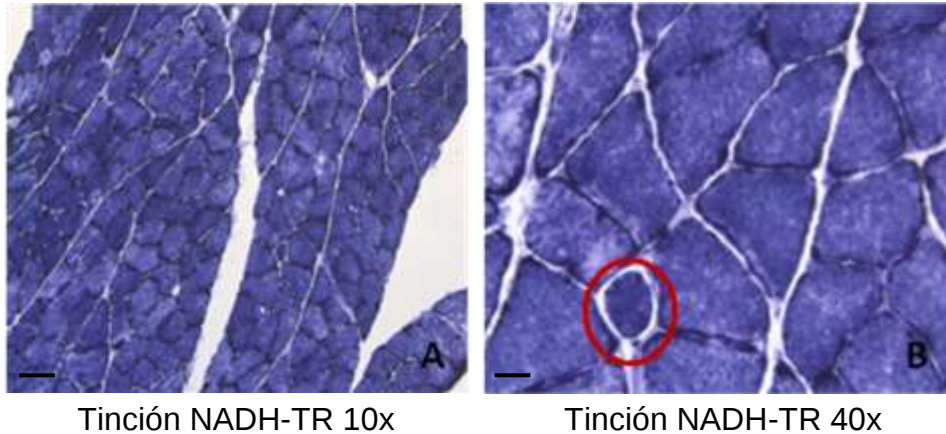
Tricrómica de Gomori modificada 40x

31. Isquemia de una hora con reperusión de cuatro días (E13) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados por el perimysio (rombos en B). Los espacios que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma se encuentran levemente aumentados. Bar: 100 micras.

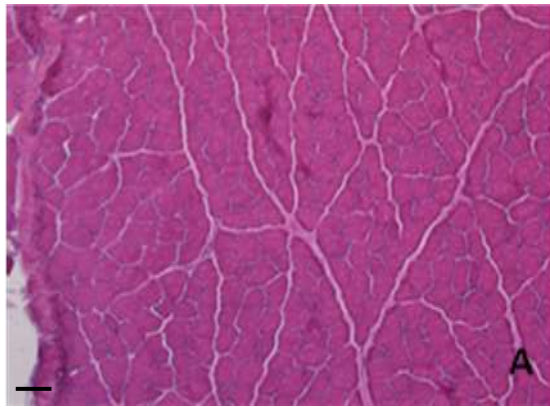
Imagen C. Imagen D. Las fibras musculares presentan formas hexagonales, uniformidad en sus tamaños y núcleos periféricos. Nótese capilarización presente en el tejido conectivo laxo que conforma el endomysio (flecha en C), e invasión celular focal en una de las fibras (círculos en C y D). Bar: 25 micras.

Fractura por congelación leve.

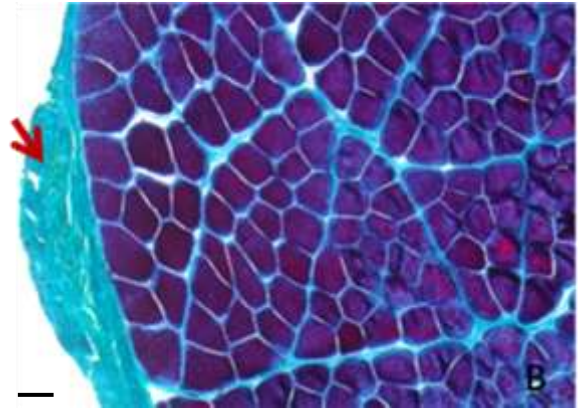


32. Isquemia de una hora con reperfusión de cuatro días (E13) de músculo sóleo izquierdo

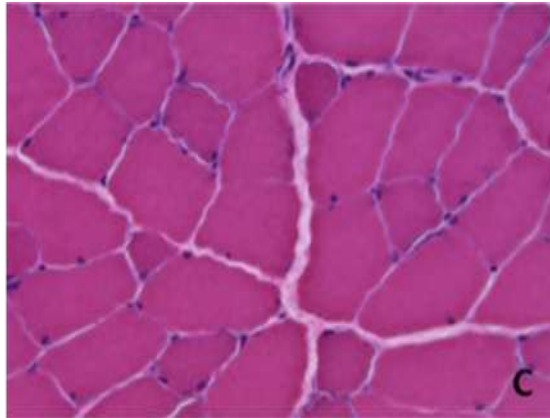
Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados en los que predominan fibras oxidativas o tipo I. Fibras tipo IIA (intermedias) y IIB (glucolíticas) ausentes. Se aprecia una fibra de menor tamaño en relación a las demás (círculo en B). Bar: 100 micras. Bar: 25 micras.



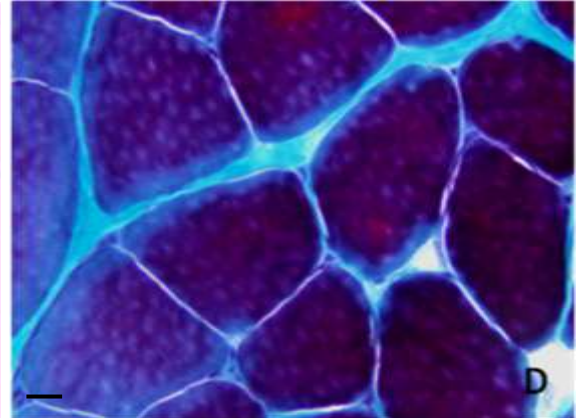
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



Tricrómica de Gomori modificada 40x

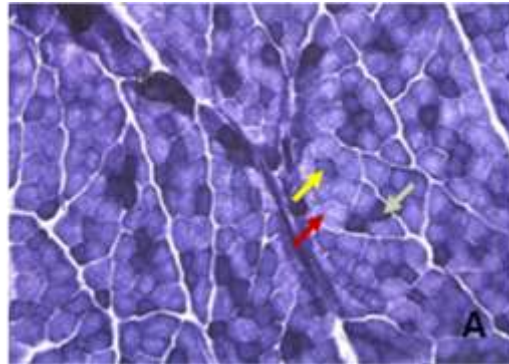
33. Isquemia de una hora con reperfusión ocho días (E15) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Se observan fascículos musculares organizados mediante tejido conectivo moderadamente denso que conforma el perimisio. Se aprecia que los espacios entre fascículos se encuentran aumentados. Bar: 100 micras.

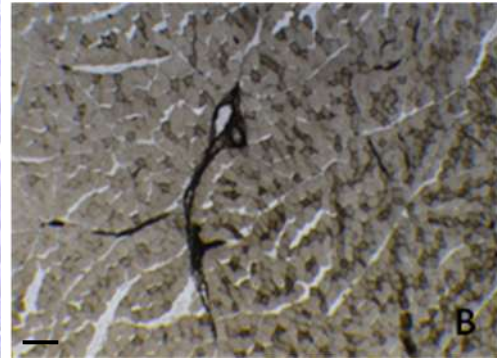
Imagen B. Se observa el epimisio (flecha) que continúa como perimisio conformado por conectivo moderadamente denso y permite la organización de las fibras musculares en fascículos. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos con forma hexagonal, tamaños variables y núcleos periféricos. El endomisio es visible en color verde en D. Bar: 25 micras.

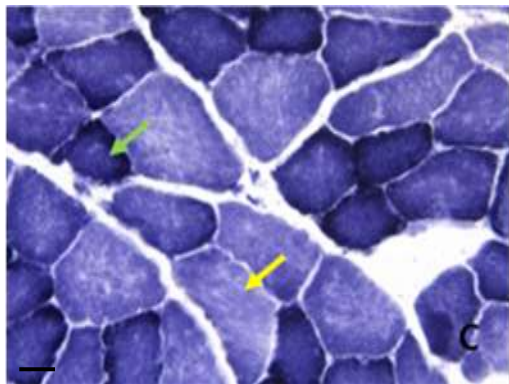
Fractura por congelación leve.



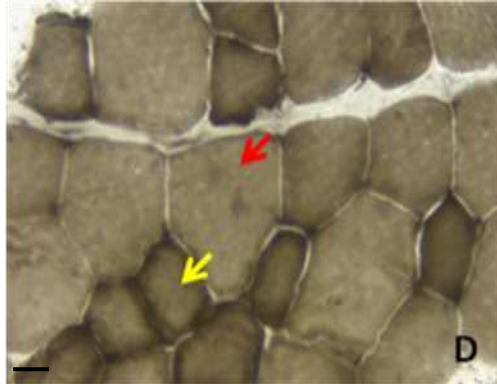
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



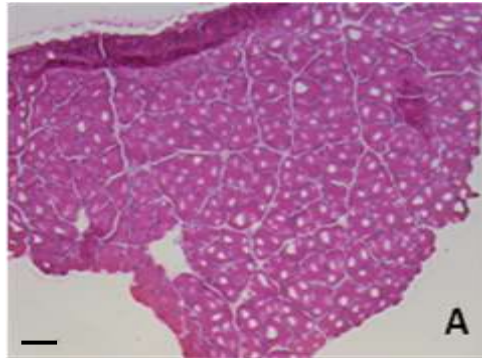
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

34. Isquemia de una hora con perfusión ocho días (E15) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

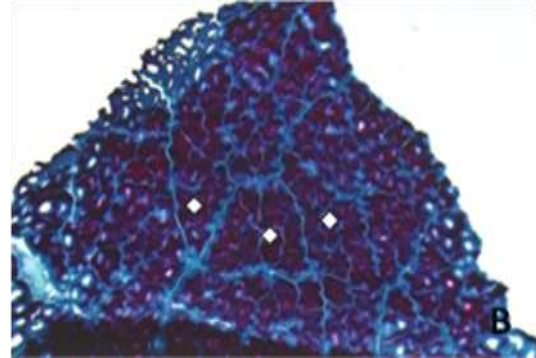
Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados y conformados por tres tipos de fibras musculares; fibras tipo I u oxidativas (flecha verde en A), fibras tipo IIA o intermedias (flecha amarilla en A) y fibras tipo IIB o glucolíticas (flecha roja en A). Se aprecia que la predominancia es de fibras de contracción intermedia (IIA). Bar: 100 micras.

Imagen C. Se aprecian fibras tipo I (flecha verde) y fibras tipo IIA (flecha amarilla). Bar: 25 micras.

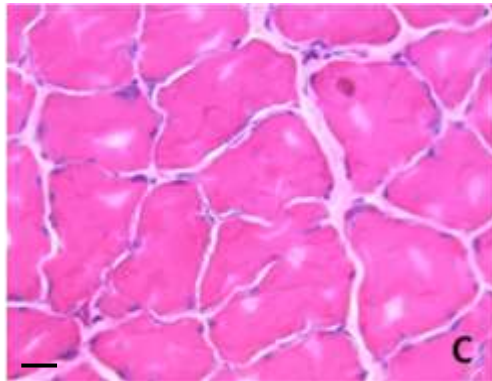
Imagen D. Predominancia de fibras tipo IIA (flecha amarilla) y IIB (flecha roja). Bar: 25 micras.



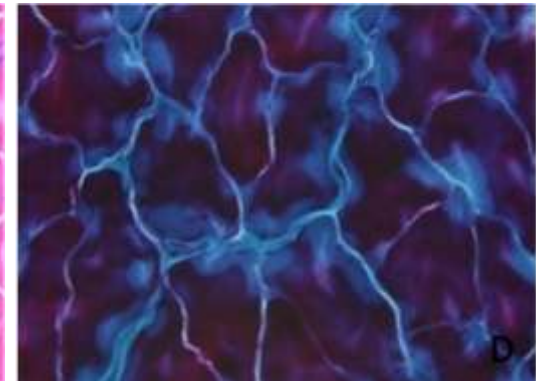
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



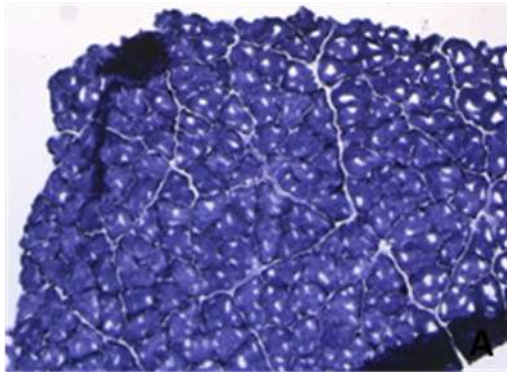
Tricrómica de Gomori modificada 40x

35. Isquemia de una hora con reperfusión ocho días (E15) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se aprecia fascículos musculares organizados por el perimisio, con aumento en el espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma (rombos en B). Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se observan miocitos hexagonales, con tamaños uniformes, presencia de bordes irregulares y núcleos con localización periférica. El espacio que ocupa el endomisio se encuentra levemente aumentado. Bar: 25 micras.

Fractura por congelación moderada.



Tinción NADH-TR 10x

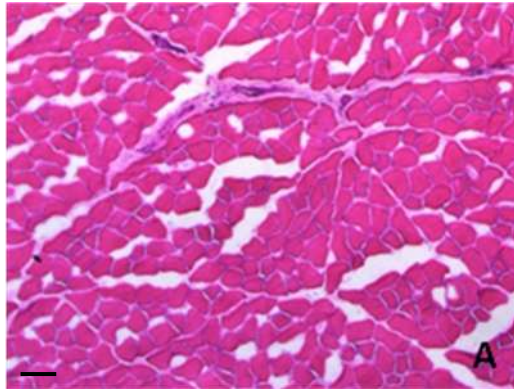


Tinción mATPasa pH 4.6 10x

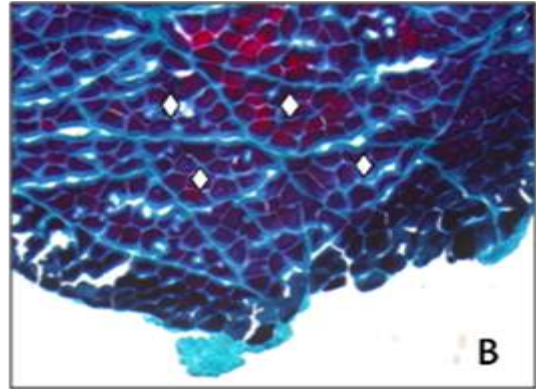
36. Isquemia de una hora con perfusión ocho días (E15) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observa organización de las fibras en fascículos musculares. Nótese la predominancia oxidativa (fibras de contracción lenta) en ambas tinciones. Bar: 100 micras.

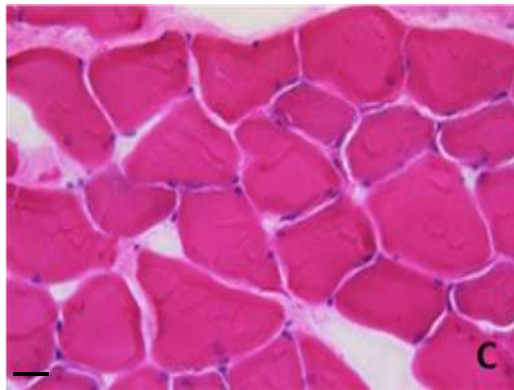
Fractura por congelación moderada.



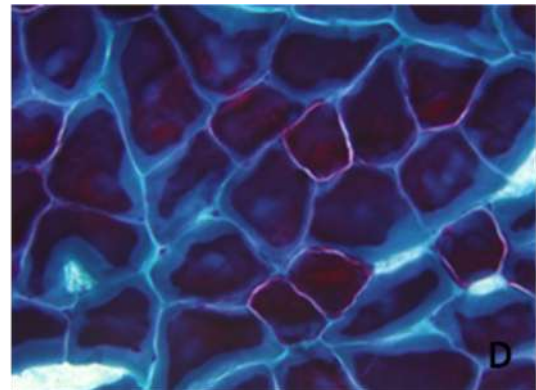
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



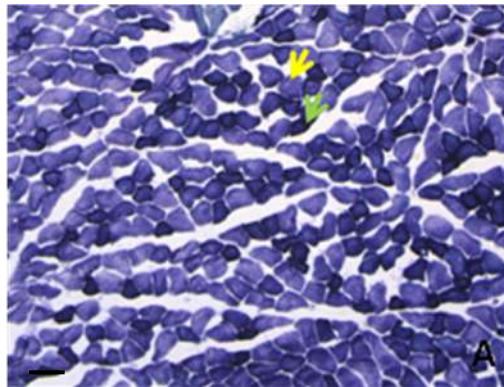
Tricrómica de Gomori modificada 40x

37. Isquemia de una hora con reperfusión de 16 días (E17) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

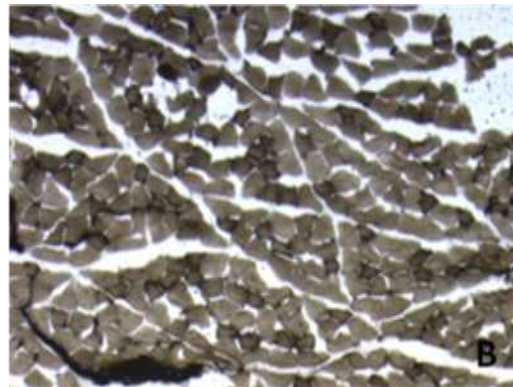
Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados por el perimysio (rombos en B), con aumento en los espacios que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Los miocitos presentan forma hexagonal, tamaños variables y núcleos periféricos. El tejido conectivo laxo que conforma el endomisio presenta escasa infiltración celular. 25 micras.

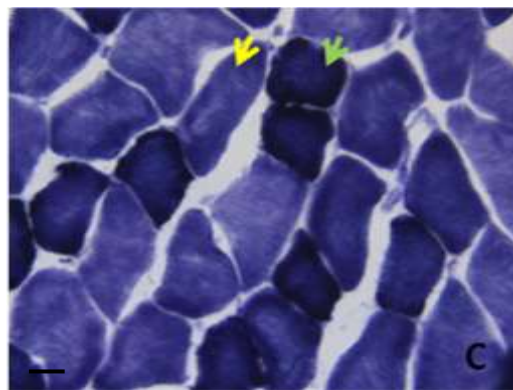
Fractura por congelación moderada.



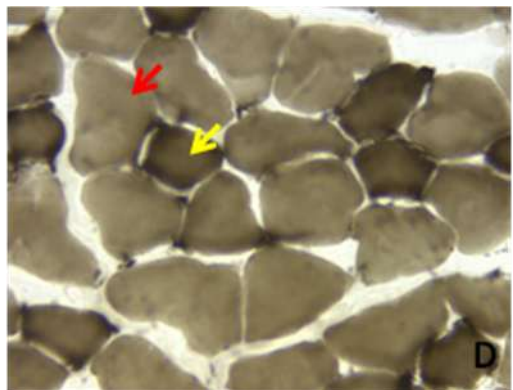
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPase pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



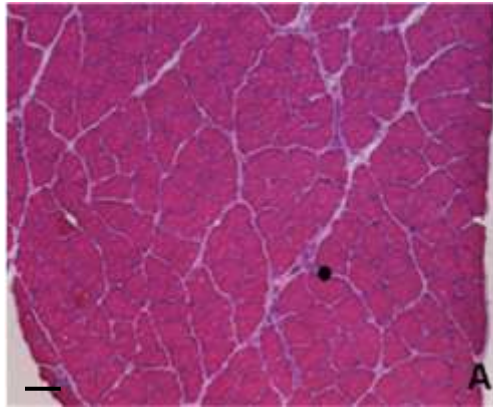
Tinción mATPase pH 4.6 40x

38. Isquemia de una hora con reperusión de 16 días (E17) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

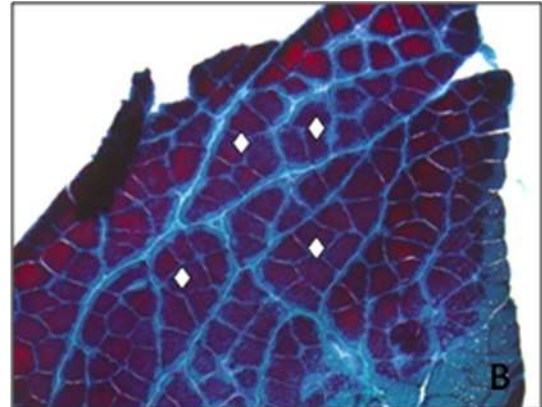
Imagen A. Imagen B. Se observa aumento en los espacios entre los fascículos musculares. La predominancia es de fibras tipo I (flecha verde en A) y IIB (flecha amarilla en A). Bar: 100 micras.

Imagen C. Se aprecian fibras tipo I (flecha verde) más pequeñas que las fibras tipo IIA (flecha amarilla) que se encuentran en mayor proporción. Bar: 25 micras.

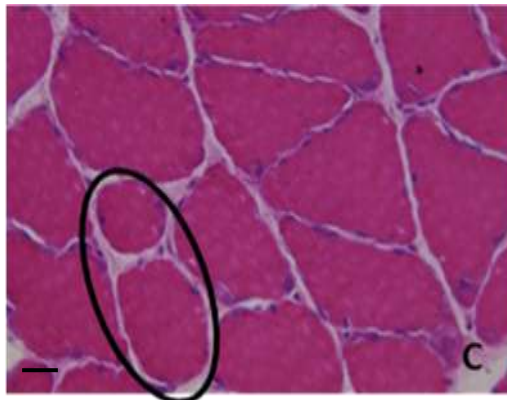
Imagen D. Se observa predominancia de fibras tipo IIA (flecha amarilla) y fibras tipo IIB (flecha roja). Bar: 25 micras.



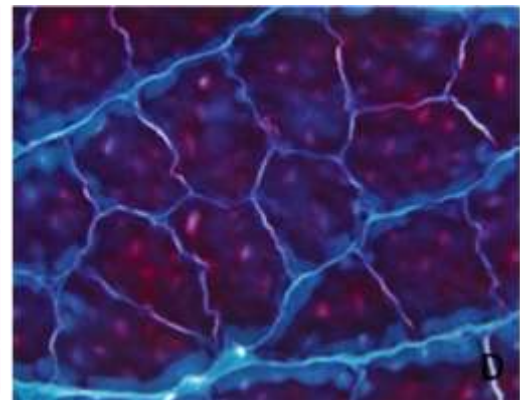
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

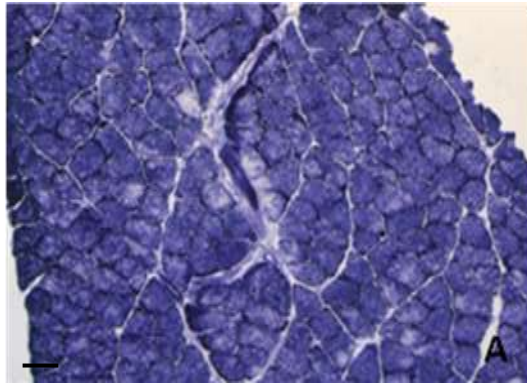


Tricrómica de Gomori modificada 40x

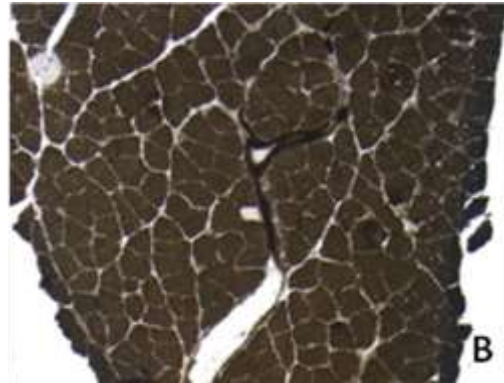
39. Isquemia de una hora con perfusión de 16 días (E17) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados mediante el perimysio (rombos en B). El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma se encuentra levemente aumentado. Nótese la presencia de vasos sanguíneos y nervios (asterisco en A). Bar: 100 micras.

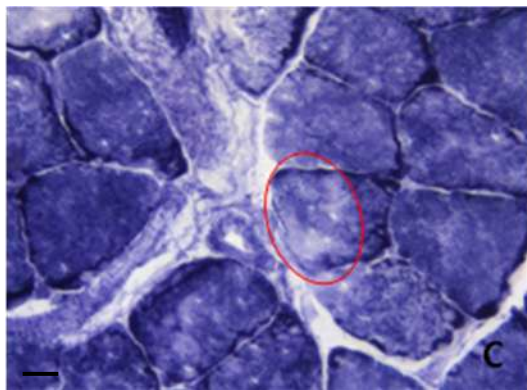
Imagen C. Imagen D. Las fibras musculares presentan en su mayoría formas hexagonales y algunas redondeadas con menor tamaño (círculo en A). Los núcleos se localizan periféricamente. Se observa aumento en el espacio que ocupa el tejido conectivo laxo que ocupa el endomisio. Bar: 25 micras.



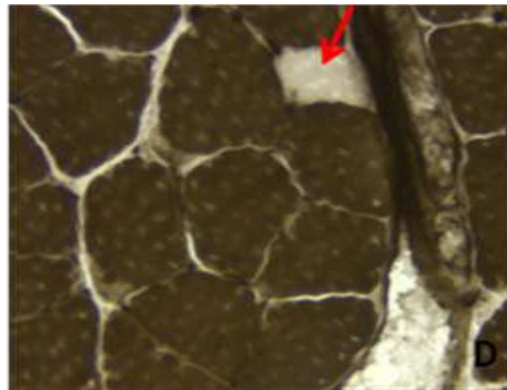
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



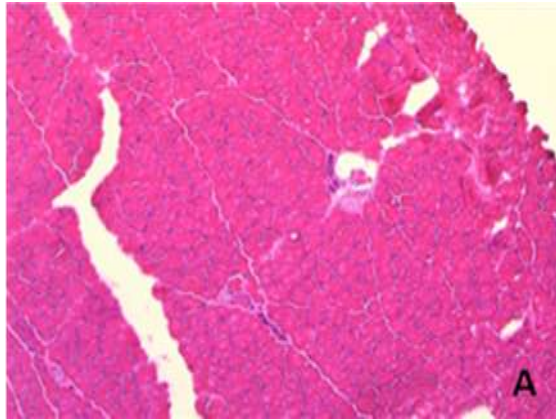
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

40. Isquemia de una hora con reperusión de 16 días (E17) de músculo sóleo izquierdo

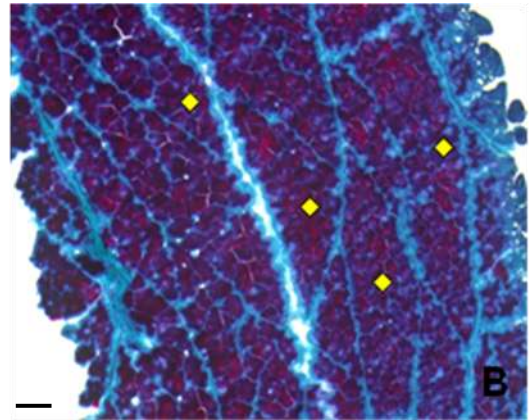
Imagen A. Imagen B. Se observa organización de fascículos musculares conformados por fibras oxidativas o tipo I. Se observan regiones claras y oscuras del citoplasma en las fibras musculares, evidentes en A. Bar: 100 micras.

Imagen C. Los miocitos carecen de homogeneidad en la tinción del citoplasma, evidenciado por tonalidades claras al interior de algunas fibras (círculo). 25 micras.

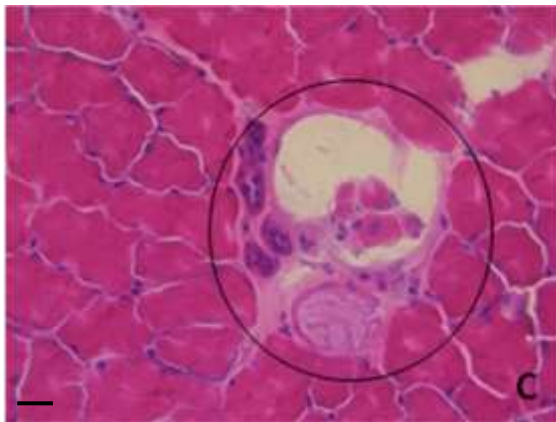
Imagen D. Predominancia de fibras tipo I o de contracción lenta en las que se observa tinción homogénea del citoplasma. Nótese la presencia de una fibra muscular tipo IIB (flecha). 25 micras.



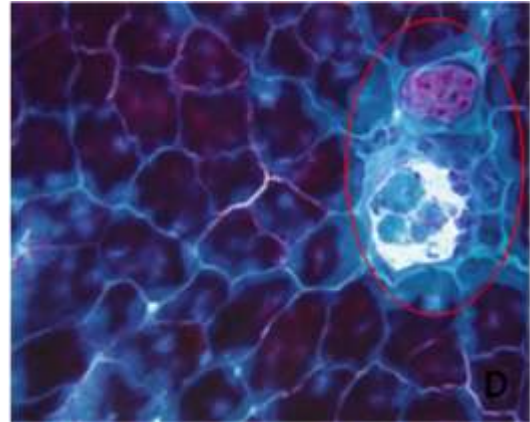
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

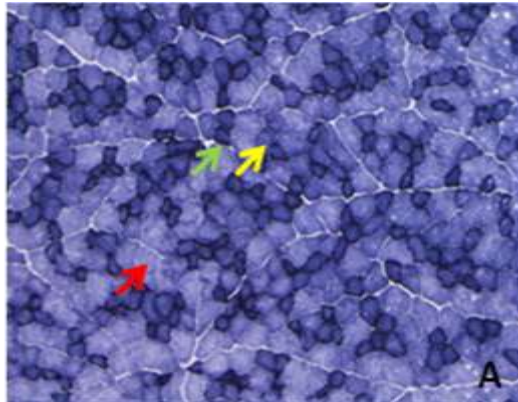


Tricrómica de Gomori modificada 40x

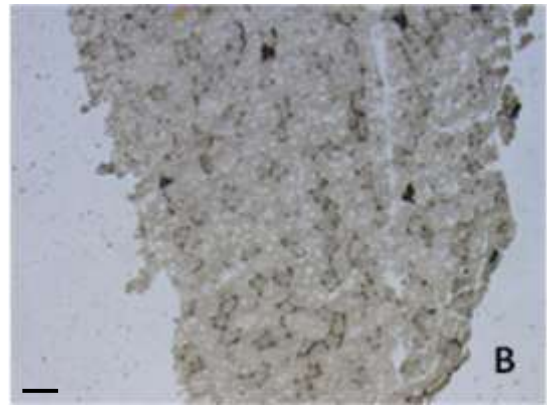
41. Isquemia de una hora con reperusión de 24 días (E19) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados, delimitados por perimisio (rombos en B). Nótese la presencia de bordes festoneados que rodean los fascículos. El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma es escaso. Bar: 100 micras.

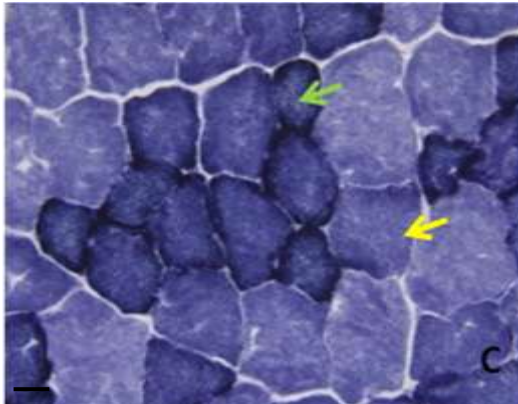
Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos hexagonales con bordes celulares irregulares, variación en sus tamaños y núcleos periféricos. El espacio que ocupa el endomisio es escaso. Detállese el huso muscular asociado a vasos sanguíneos y un nervio periférico (círculo en ambas imágenes). 25 micras.



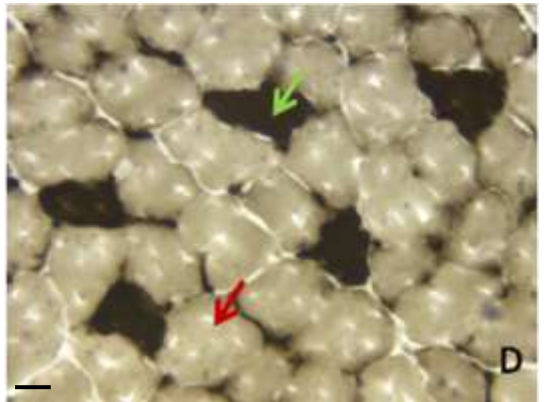
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



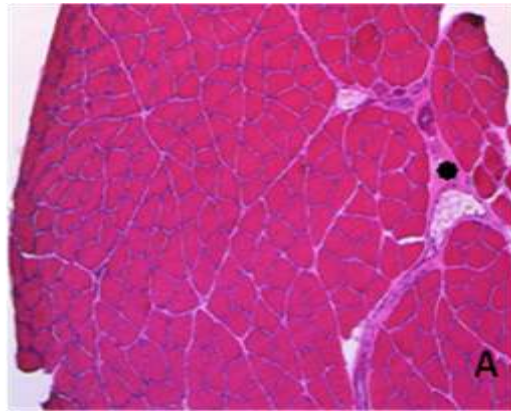
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

42. Isquemia de una hora con perfusión de 24 días (E19) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

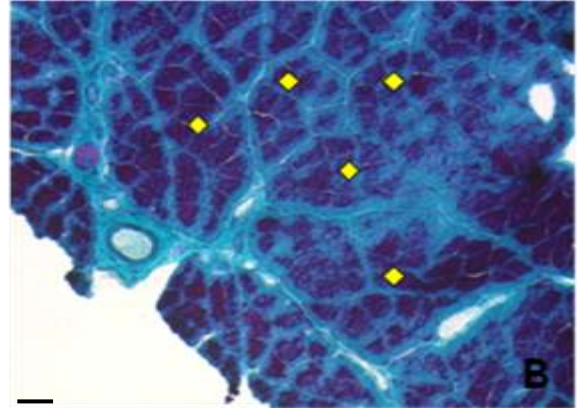
Imagen A. Imagen B. Se aprecian fascículos musculares definidos y conformados por tres tipos de fibras musculares; fibras tipo I u oxidativas (flecha verde en A), fibras tipo IIA o intermedias (flecha amarilla en A) y fibras tipo IIB o glucolíticas (flecha roja en A). La predominancia es de fibras de contracción intermedia. Bar: 100 micras.

Imagen C. Se observan fibras tipo I (flecha verde) y fibras tipo IIA (flecha amarilla). Bar: 25 micras.

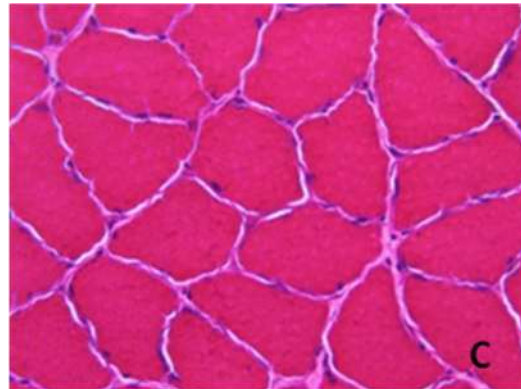
Imagen D. Se presenta fibras tipo I (flecha verde) y IIB (flecha roja). La predominancia es de fibras tipo IIB o de contracción rápida. Bar: 25 micras. Fractura por congelación leve.



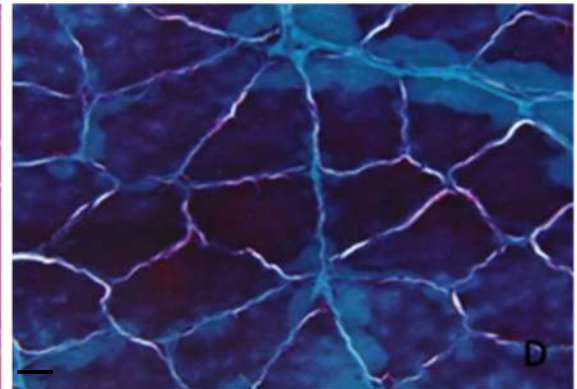
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

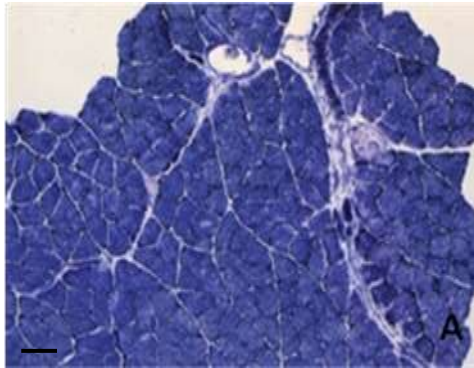


Tricrómica de Gomori modificada 40x

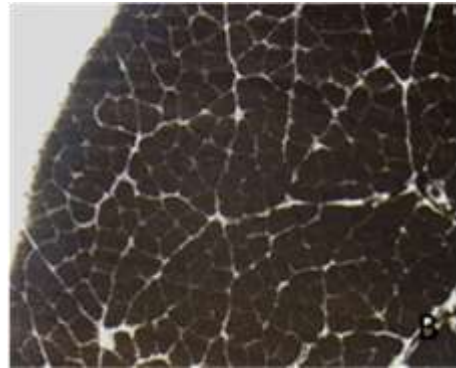
43. Isquemia de una hora con reperusión de 24 días (E19) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observa fascículos musculares organizados por el perimysio (rombos en B). El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma es escaso. Nótese la presencia de vasos sanguíneos y nervios (asterisco en A). Bar: 100 micras.

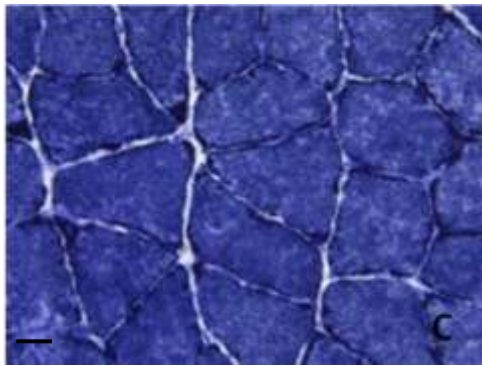
Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos con formas hexagonales, uniformidad en sus tamaños, núcleos periféricos y escaso espacio ocupado por el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio. Bar: 25 micras.



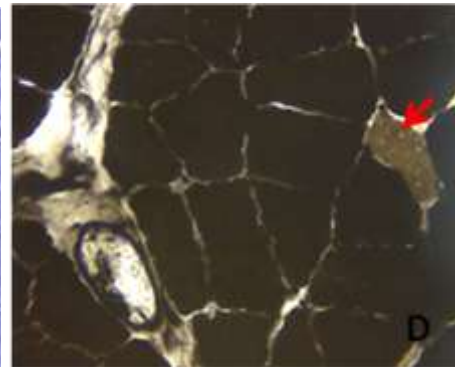
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

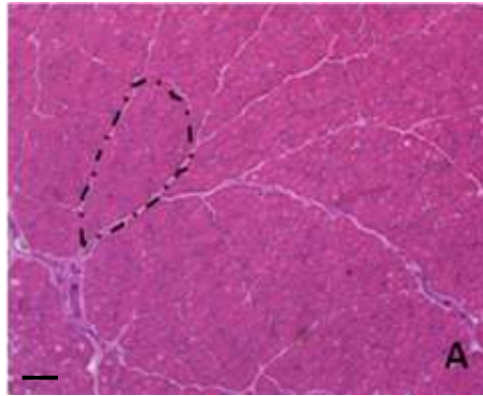


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

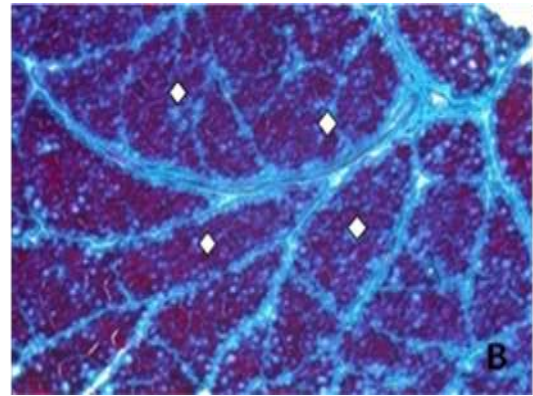
44. Isquemia de una hora con perfusión de 24 días (E19) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Los fascículos musculares se encuentran organizados y conformados por fibras con predominancia oxidativa o tipo I. Bar: 100 micras.

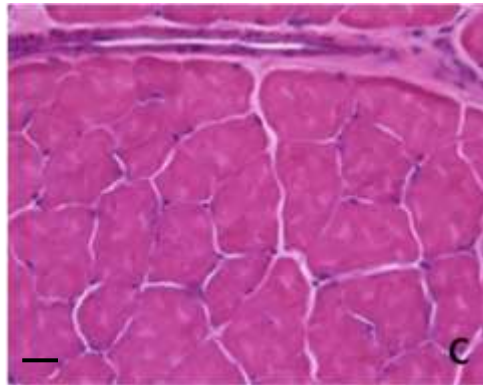
Imagen C. Imagen D. Se aprecian fibras de contracción lenta o tipo I. Nótese la presencia de una fibra tipo IIA (flecha en D). 25 micras.



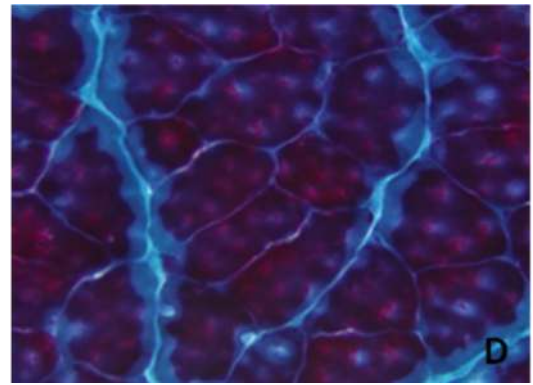
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

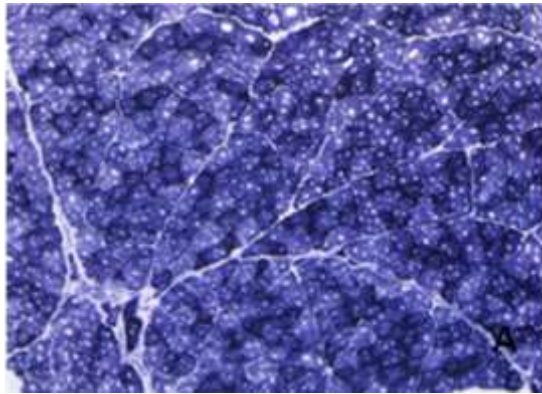


Tricrómica de Gomori modificada 40x

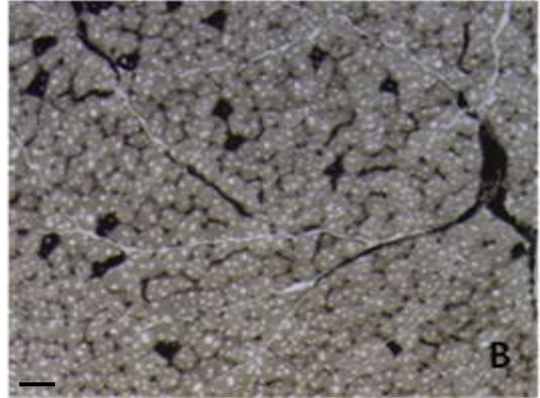
45. Isquemia de una hora con perfusión de 32 días (E21) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares definidos por el perimysio (rombos en B). El tejido conectivo moderadamente denso que rodea cada fascículo ocupa un espacio reducido. Bar: 100 micras.

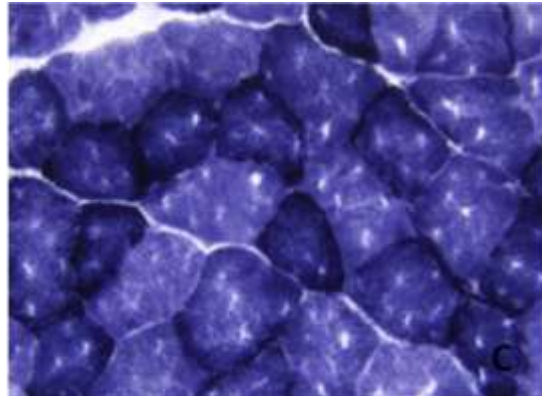
Imagen C. Imagen D. Los miocitos presentan formas hexagonales, tamaños variables, núcleos centrales y se encuentran rodeados por tejido conectivo laxo. Los espacios que ocupa el conectivo entre las fibras son escasos. Bar: 25 micras.



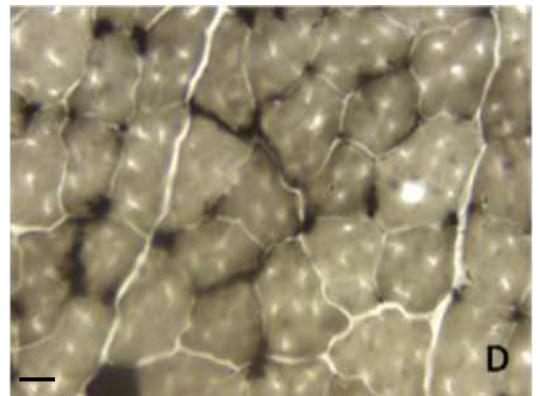
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



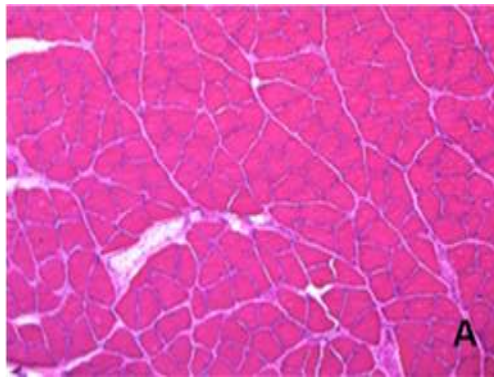
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

46. Isquemia de una hora con reperfusión de 32 días (E21) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

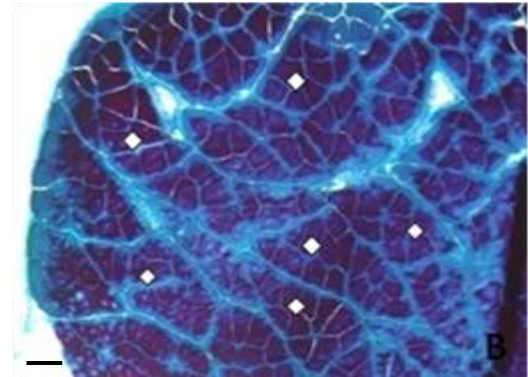
Imagen A. Imagen B. Los fascículos musculares se observan definidos y conformados por fibras tipo I y tipo IIA predominantemente. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se observan fibras oxidativas con tinción oscura y fibras de contracción intermedia o tipo IIA con tinción más clara. Bar: 25 micras.

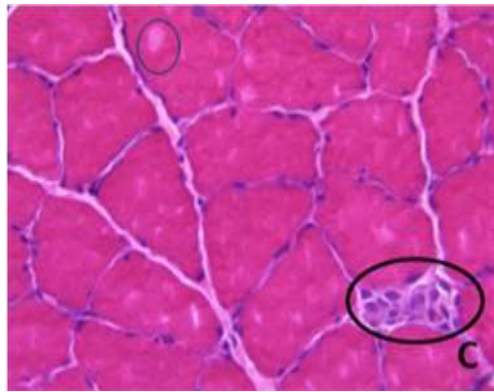
Fractura por congelación moderada.



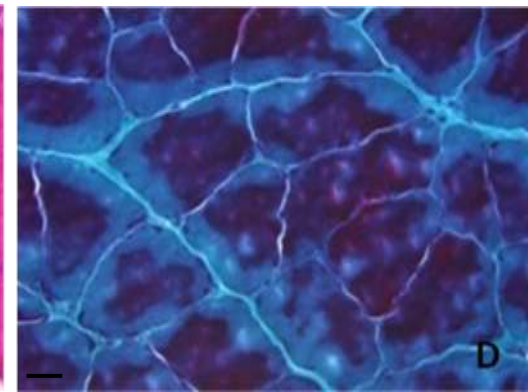
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

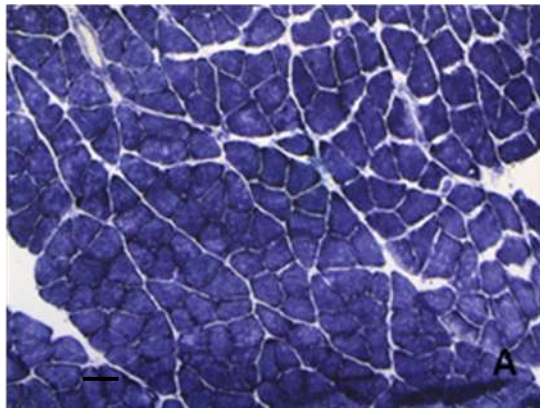


Tricrómica de Gomori modificada 40x

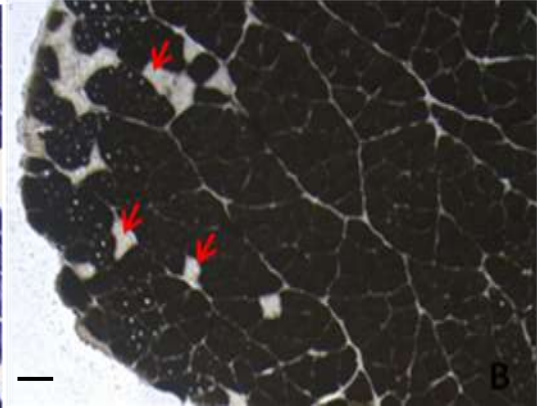
47. Isquemia de una hora con perfusión de 32 días (E21) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se aprecian fascículos musculares organizados por el perimysio (rombos en B), conformado por un tejido conectivo moderadamente denso que ocupa poco espacio entre fascículos. Bar: 100 micras.

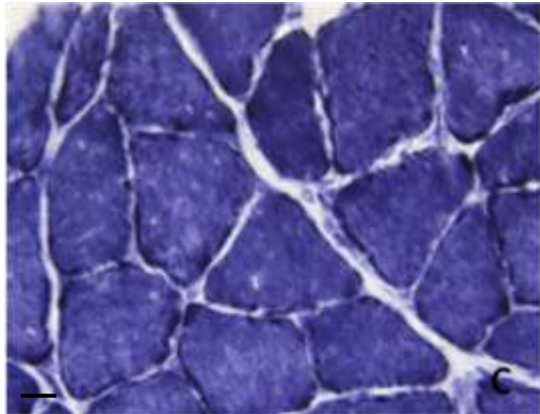
Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos hexagonales, con tamaños uniformes y núcleos periféricos. El espacio que ocupa el tejido conectivo laxo que forma el endomisio es escaso. Nótese infiltración celular focal en una de las fibras (círculo en C). Bar: 25 micras.



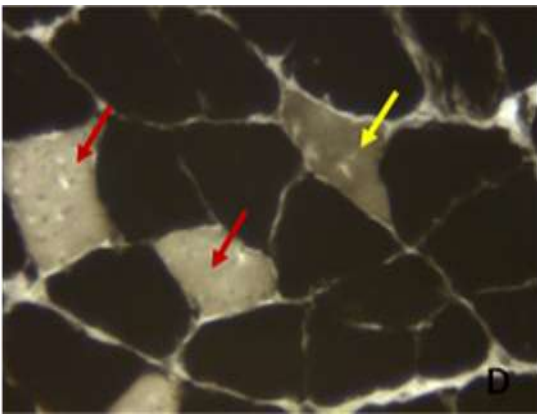
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPase pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



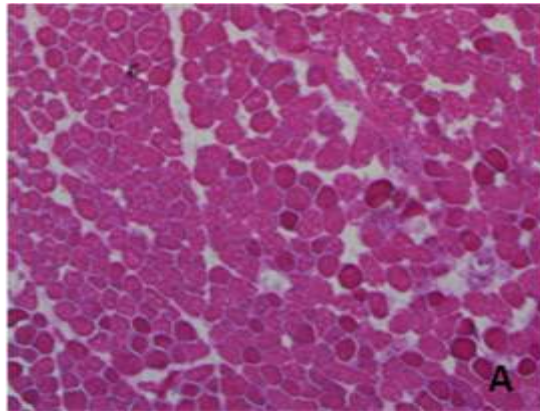
Tinción mATPase pH 4.6 40x

48. Isquemia de una hora con reperfusión de 32 días (E21) de músculo sóleo izquierdo

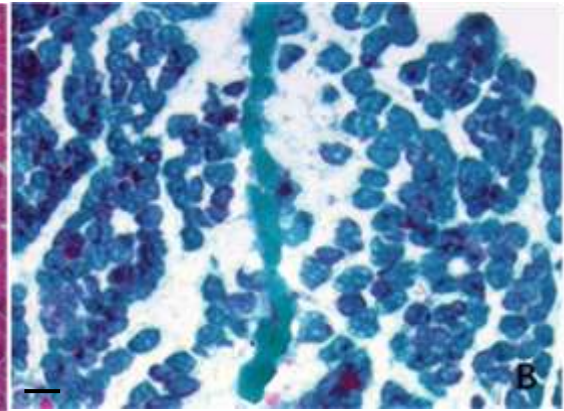
Imagen A. Se observan fascículos musculares organizados y conformados por fibras oxidativas o tipo I. Bar: 100 micras.

Imagen B. Nótese en la región izquierda la presencia de fibras tipo IIB o glucolíticas (flechas). Bar: 100 micras.

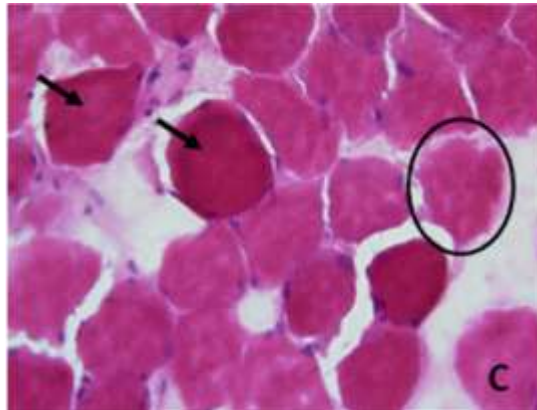
Imagen C. Imagen D. Predominancia oxidativa, fibras de contracción lenta o de fibras tipo I. La flecha amarilla en D señala una fibra tipo IIA y las flechas rojas en D señalan fibras tipo IIB. Bar: 25 micras.



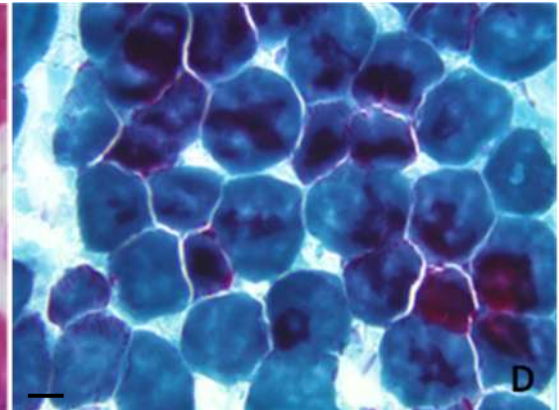
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

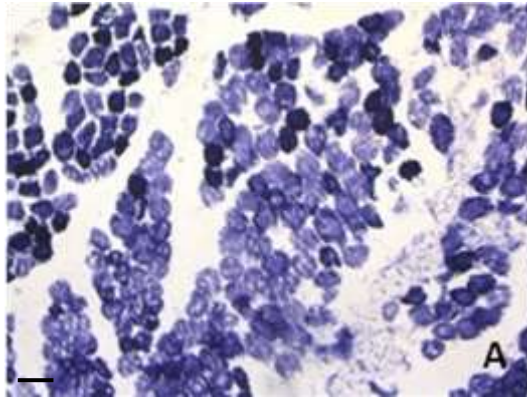


Tricrómica de Gomori modificada 40x

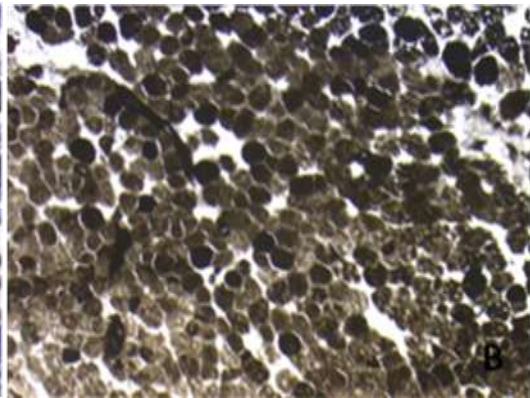
49. Isquemia de tres horas con reperusión de una hora (E23) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se aprecian cambios importantes en la organización del tejido muscular estriado esquelético, que incluyen fibras colágenas escasas, predominio del componente no fibrilar de la matriz extracelular, ausencia de fascículos musculares definidos y aumento considerable de los espacios que ocupa el tejido conectivo. Bar: 100 micras.

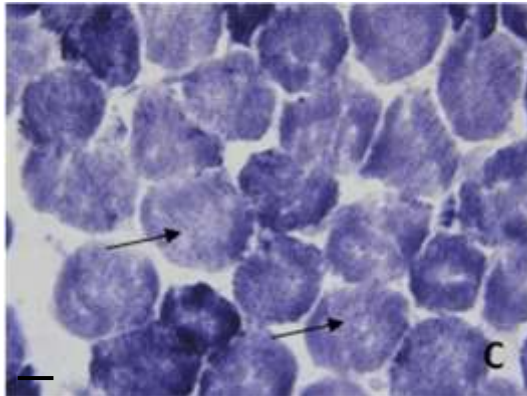
Imagen C. Imagen D. Las fibras musculares se observan redondeadas y con variación considerable en los tamaños. Los miocitos más grandes aparentemente edematizados (flechas en C), presentan tinción eosinófila intensa; por otra parte, los pequeños presentan atrofia, tinción menos acidófila y falta de homogeneidad en la tinción citoplasmática (círculo en C). Algunas fibras presentan núcleos periféricos y otras, núcleos ausentes (círculo en C). La infiltración celular es moderada en el conectivo y ausente en las fibras musculares. Bar: 25 micras.



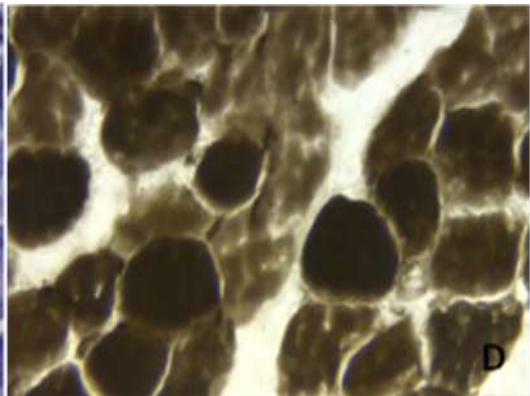
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

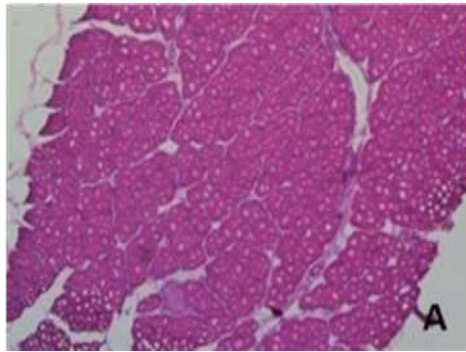


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

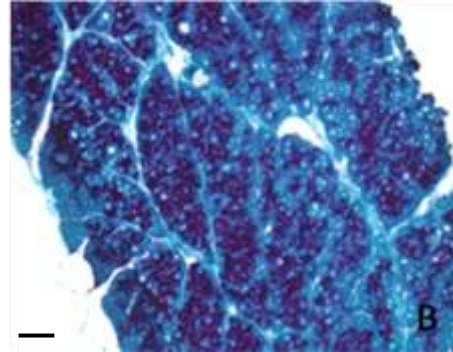
50. Isquemia de tres horas con reperfusión de una hora (E23) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se aprecian cambios en la predominancia de las fibras, que corresponde a oxidativa o tipo I, cuya reacción es intensa en las fibras. Los miocitos tipos IIB o glucolíticos se encuentran ausentes. Bar: 100 micras.

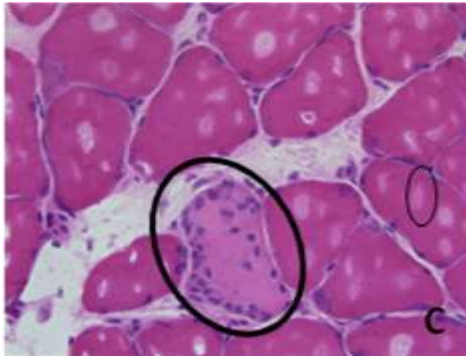
Imagen C. Imagen D. Se observa predominio de fibras tipo I. Se aprecia un patrón de moteado en el citoplasma celular dado por desorganización del componente miofibrilar en la célula (flechas en C). Bar: 25 micras.



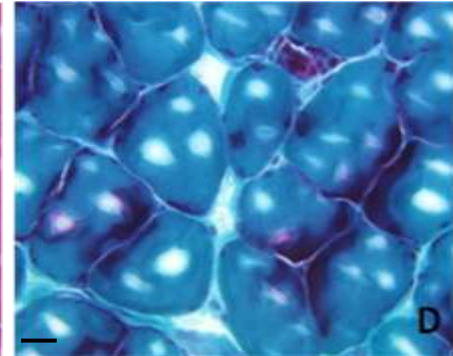
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



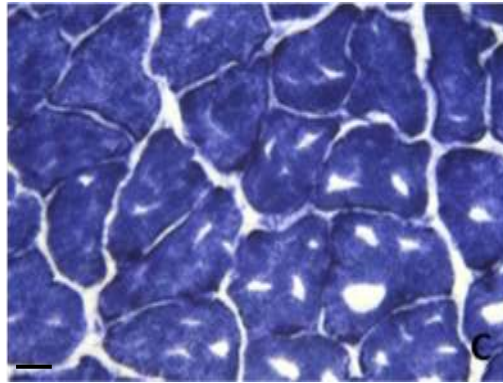
Tricrómica de Gomori modificada 40x

51. Isquemia de tres horas con reperfusión de una hora (E23) de músculo sóleo izquierdo

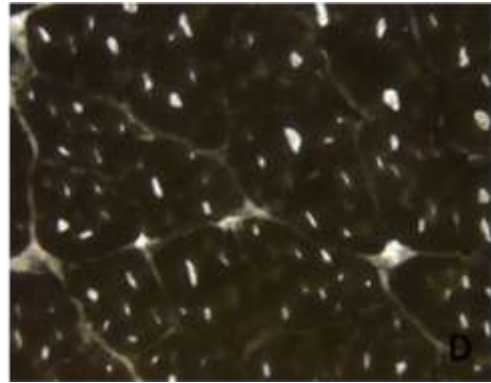
Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares delimitados por el perimisio. El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma se encuentra aumentado. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Los miocitos presentan formas ligeramente triangulares, tamaños disminuidos y variables, núcleos periféricos. El citoplasma celular carece de homogeneidad, dado por regiones eosinófilas claras en las fibras (círculo pequeño en C). Se aprecia invasión celular focal en una de las fibras (círculo grande en C). El espacio que ocupa el endomisio se encuentra aumentado y la infiltración en el tejido conectivo laxo que lo conforma es moderada. Bar: 25 micras.

Fractura por congelación moderada.



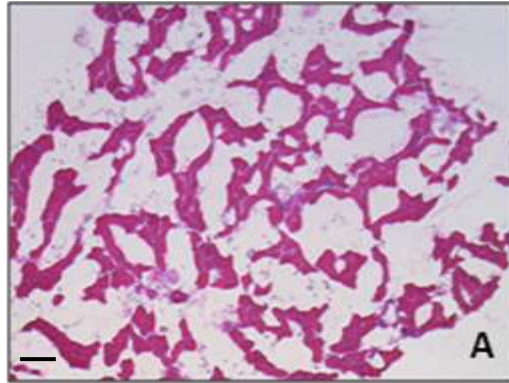
Tinción NADH-TR 40x



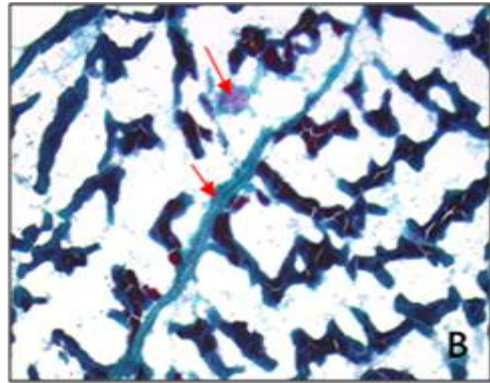
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

52. Isquemia de tres horas con reperusión de una hora (E23) de músculo sóleo izquierdo

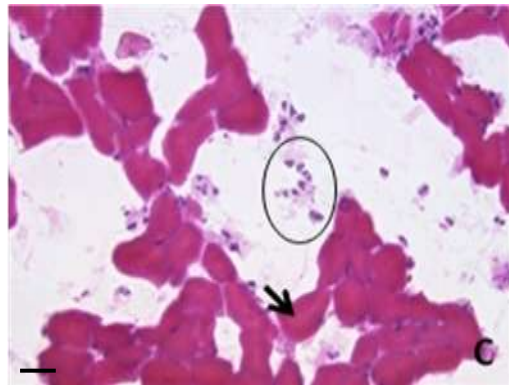
Imagen A. Imagen B. Se observa predominancia oxidativa, de fibras de contracción lenta o de fibras tipo I. Bar: 25 micras.
Fractura por congelación moderada.



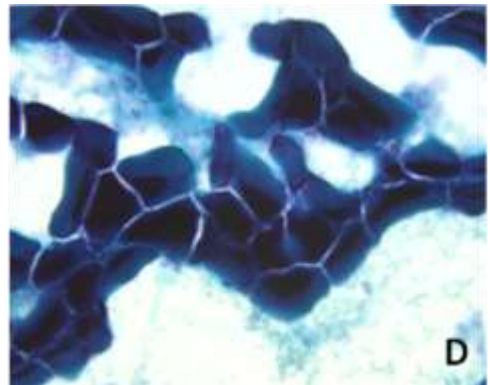
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

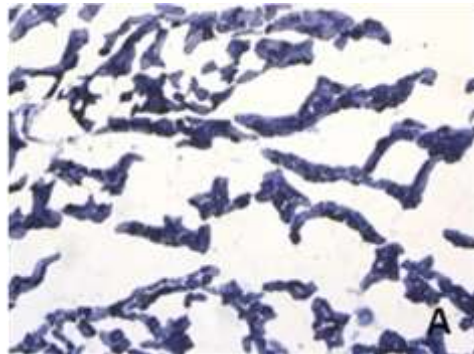


Tricrómica de Gomori modificada 40x

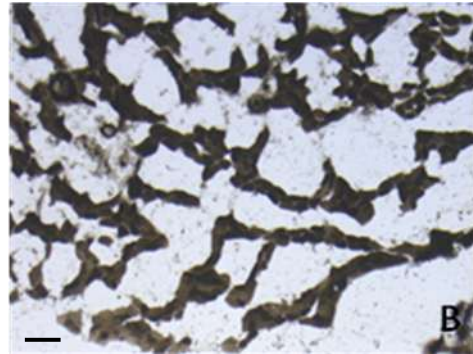
53. Isquemia de tres horas con reperusión 16 horas (E25) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observa pérdida completa de la organización histológica normal. Se aprecian grupos aislados de fibras musculares con amplios espacios en los que predomina el componente no fibrilar de la matriz extracelular. Se conservan algunos vasos sanguíneos y nervios (flechas en B). Bar: 100 micras.

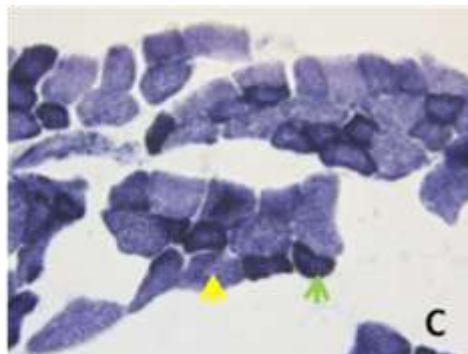
Imagen C. Imagen D. Los miocitos presentan formas irregulares o redondeadas, bordes oscuros y centro claro a manera de fibras en anillo (flecha en C); tamaño pequeño, núcleos ausentes en algunos y de localización periférica en otros. Se aprecia elevada infiltración por polimorfonucleares en el conectivo (círculo en C). Bar: 25 micras.



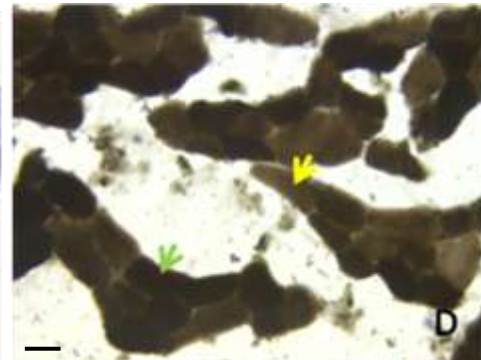
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPase pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

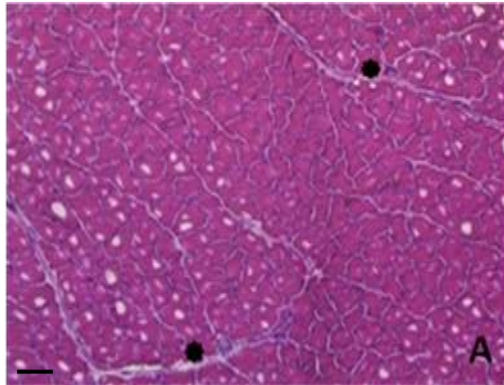


Tinción mATPase pH 4.6 40x

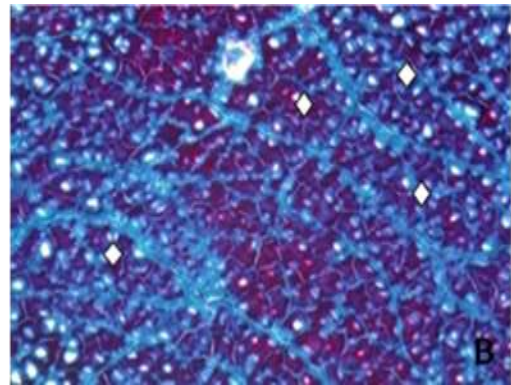
54. Isquemia de tres horas con reperusión 16 horas (E25) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Las fibras musculares reaccionan fuertemente en ambas tinciones, por lo que fibras tipo IIB están ausentes. Bar: 100 micras.

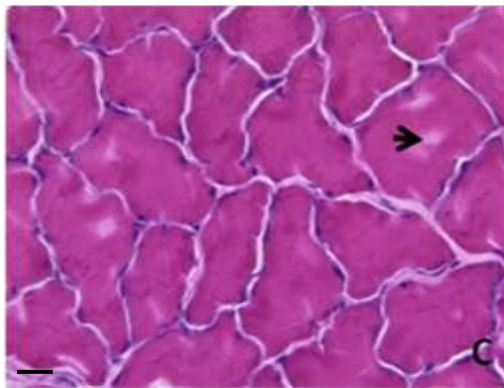
Imagen C. Imagen D. La predominancia es oxidativa con fibras tipo I (flecha verde) y tipo IIA (flecha amarilla). Se observa patrón de moteado en la fibras tipo IIA. Bar: 25 micras.



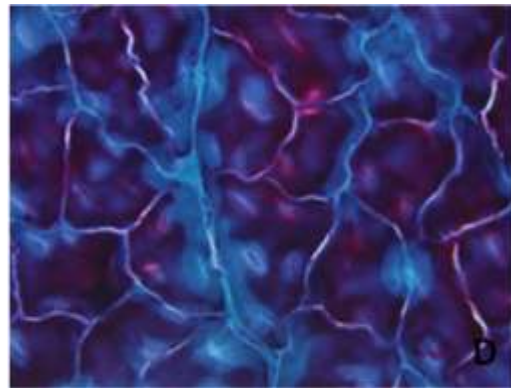
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

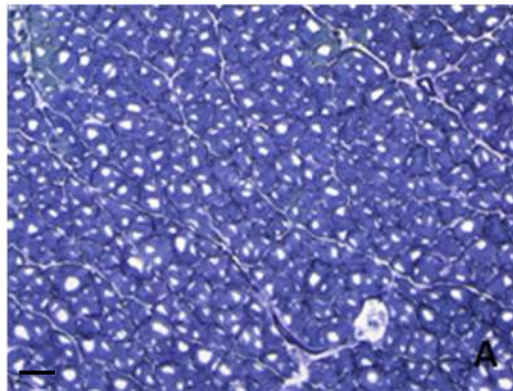


Tricrómica de Gomori modificada 40x

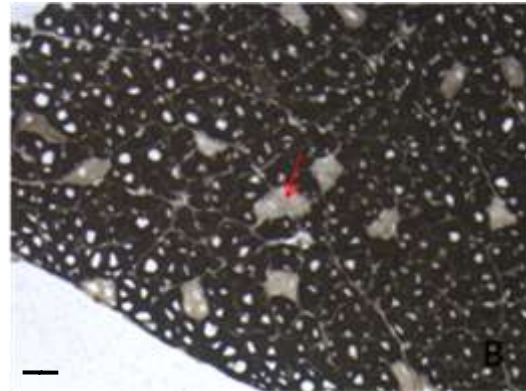
55. Isquemia de tres horas con reperusión 16 horas (E25) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares definidos por el perimisio (rombos en B). El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma se encuentra aumentado. Bar: 100 micras.

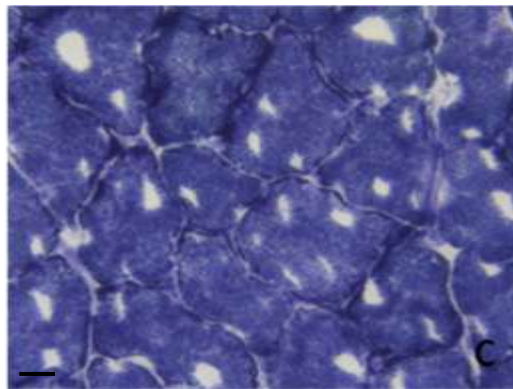
Imagen C. Imagen D. Los miocitos se observan hexagonales, tamaños uniformes, bordes irregulares y los núcleos se localizan periféricamente. Se observa falta de homogeneidad en la tinción del citoplasma dado por regiones con eosinofilia clara (flecha en C). El espacio que ocupa el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio se encuentra levemente aumentado. Bar: 25 micras.



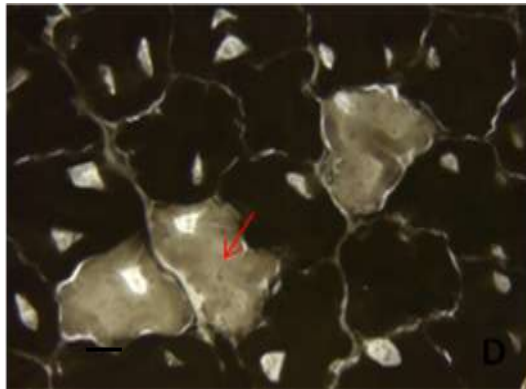
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



Tinción mATPasa pH 4.6 40x

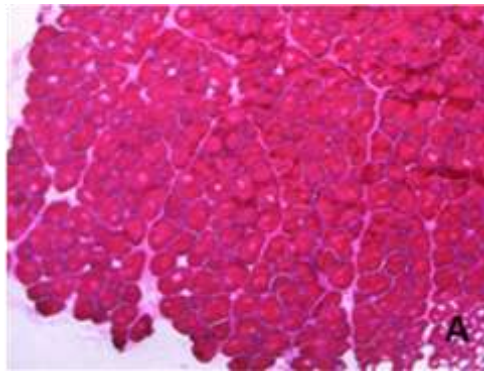
56. Isquemia de tres horas con reperusión 16 horas (E25) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Se observan fascículos musculares organizados, conformados por fibras oxidativas o tipo I. Bar: 100 micras.

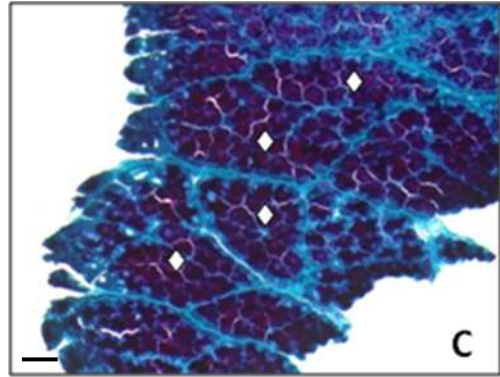
Imagen B. La predominancia de fibras musculares es oxidativa con presencia de fibras tipo IIB en poca cantidad (flecha). Bar: 100 micras.

Imagen C. Se observa predominancia oxidativa o de fibras tipo I. Bar: 25 micras.

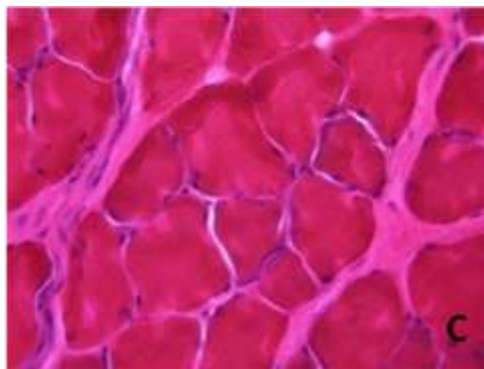
Imagen D. Se aprecian tres fibras de contracción rápida tipo IIB (flecha). Bar: 25 micras.



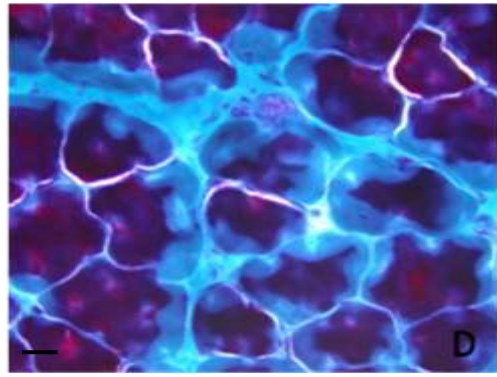
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

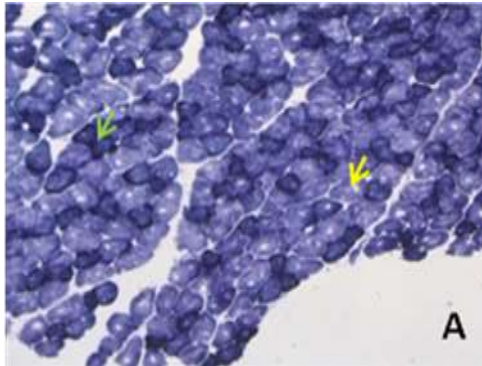


Tricrómica de Gomori modificada 40x

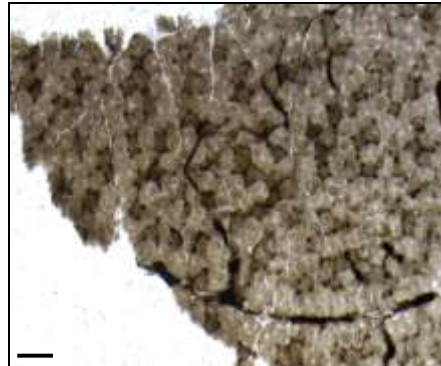
57. Isquemia de tres horas con reperfusión de un día (E27) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares rodeados por perimisio (rombos en B). El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma se encuentra aumentado. Bar: 100 micras.

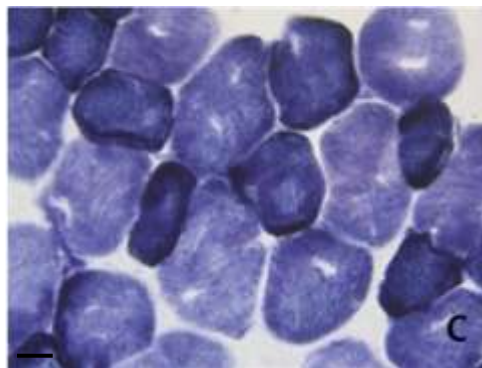
Imagen C. Imagen D. Los miocitos se aprecian redondeados, con variación en los tamaños y núcleos periféricos. Se observa falta de homogeneidad en la tinción del citoplasma y presencia de bordes oscuros en la periferia de la célula. Infiltración celular escasa en el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio; los espacios entre fibras musculares se encuentran aumentados. Bar: 25 micras.



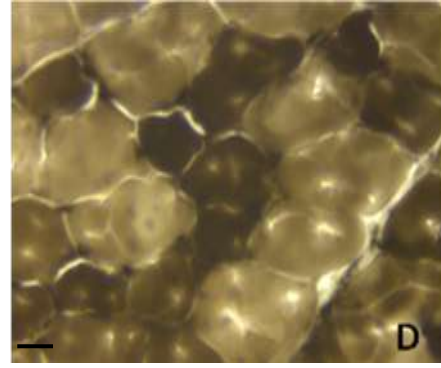
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



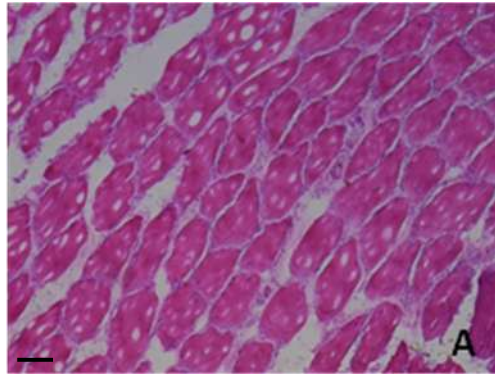
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

58. Isquemia de tres horas con reperusión de un día (E27) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

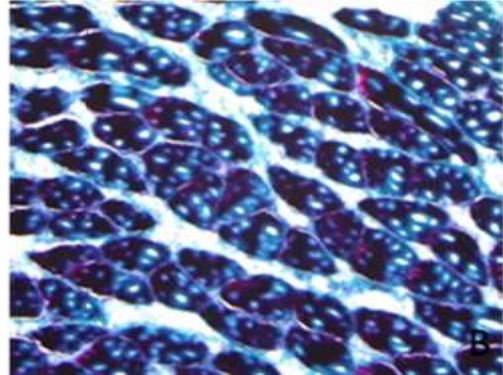
Imagen A. Imagen B. Se observan fibras oxidativas o tipo I (flecha verde) y fibras intermedias o tipo IIA (flecha amarilla). La predominancia es de fibras tipo IIA. Bar: 100 micras.

Imagen C. Se aprecia en las fibras oxidativas, con tinción oscura, la presencia de bordes oscuros en la periferia a manera de anillo. Bar: 25 micras.

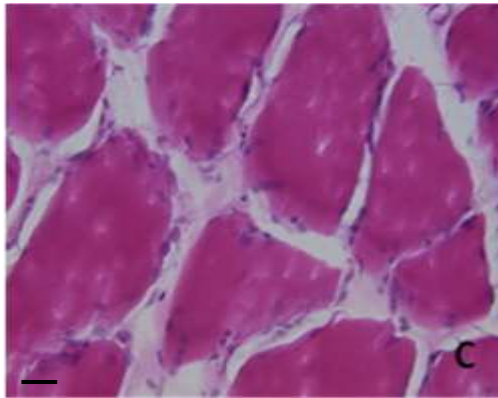
Imagen D. Se observan miocitos tipo I y tipo IIA. La predominancia corresponde a las fibras tipo IIA o de contracción intermedia. Bar: 25 micras.
Fractura por congelación moderada.



Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



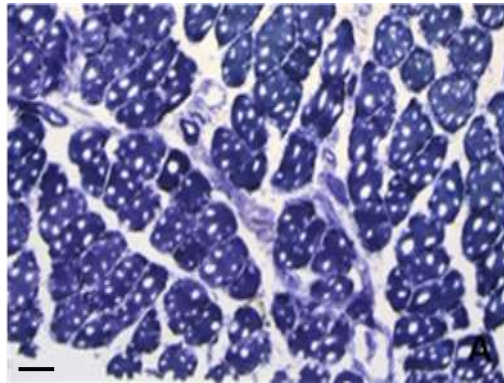
Hematoxilina- eosina 40x

59. Isquemia de tres horas con reperusión de un día (E27) de músculo sóleo izquierdo

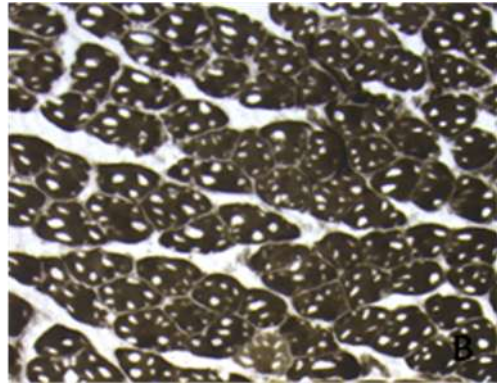
Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares desorganizados con un aumento considerable en el espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que conforma el perimysio. Infiltración celular moderada Bar: 100 micras.

Imagen C. Los miocitos se observan hexagonales a redondeados, grandes, núcleos periféricos y rodeadas por tejido conectivo laxo que conforma el endomisio. Los espacios entre las fibras se encuentran aumentados y presentan infiltración celular moderada. Bar: 25 micras.

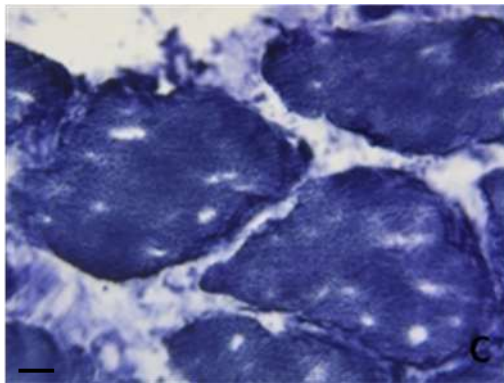
Fractura por congelación moderada.



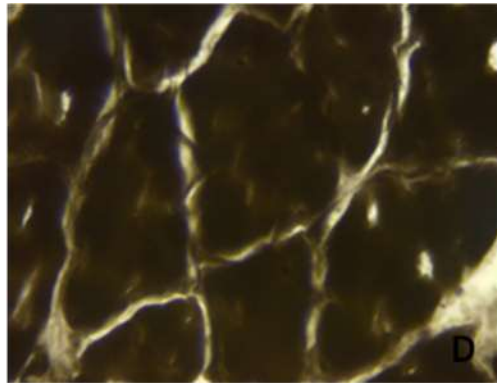
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

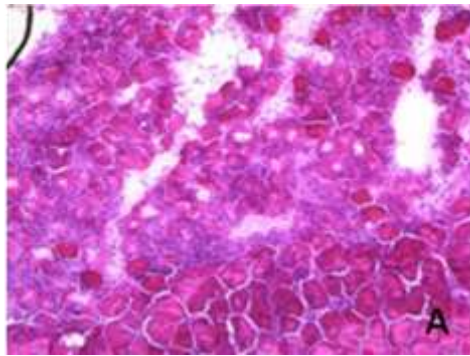


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

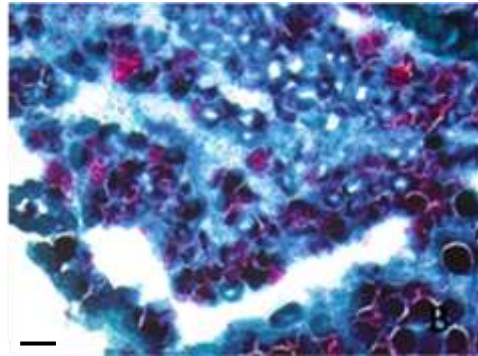
60. Isquemia de tres horas con reperusión de un día (E27) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se aprecian espacios visibles entre fascículos musculares. La predominancia de fibras que los conforman es oxidativa, de fibras tipo I o de contracción lenta. Bar: 100 micras.

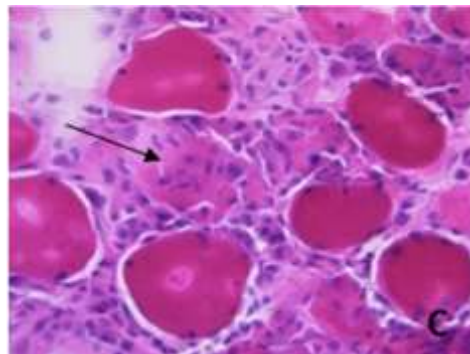
Imagen C. Imagen D. Se observa aumento en el espacio que ocupa el endomisio. La reactividad en las tinciones corresponde a fibras tipo I. Fractura por congelación moderada. Bar: 25 micras.



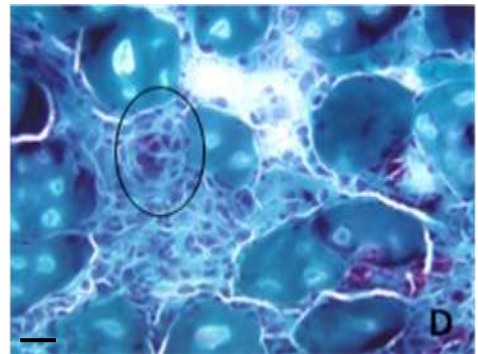
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

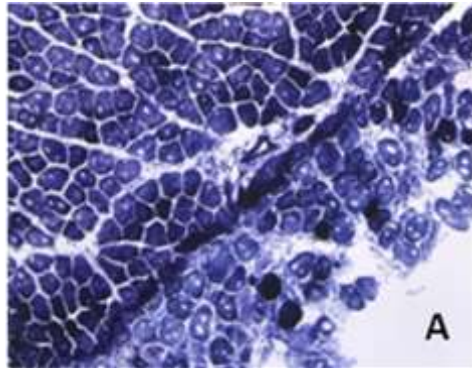


Tricrómica de Gomori modificada 40x

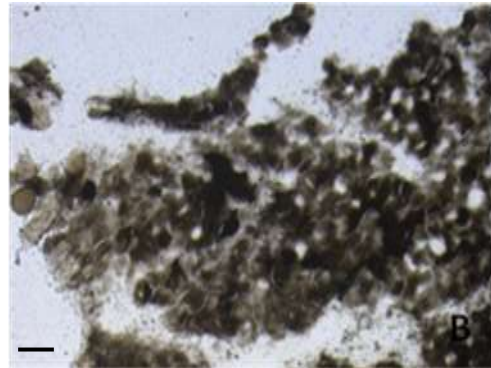
61. Isquemia de tres horas con reperfusión de dos días (E29) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan amplios espacios entre fibras musculares y grupo aislados de miocitos que no constituyen fascículos musculares. La infiltración celular presente en el tejido conectivo es abundante. Bar: 100 micras

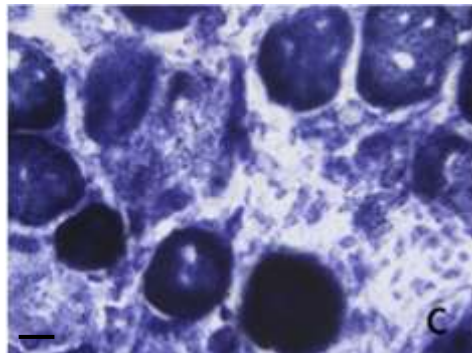
Imagen C. Imagen D. Las fibras musculares en medio de la infiltración presentan formas redondeadas, tamaños variables, núcleos periféricos y se encuentran rodeadas por tejido conectivo laxo, en el que se observa una elevada infiltración celular y amplios espacios entre miocitos. Nótese invasión celular focal en varias de las fibras (flecha en C) y, agregación de células indiferenciadas para formar una estructura redondeada y definida presente en el tejido conectivo (círculo en D). Bar: 25 micras.



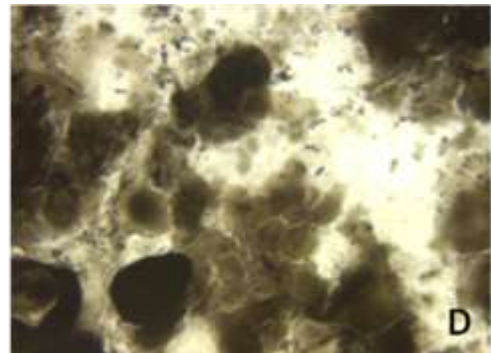
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

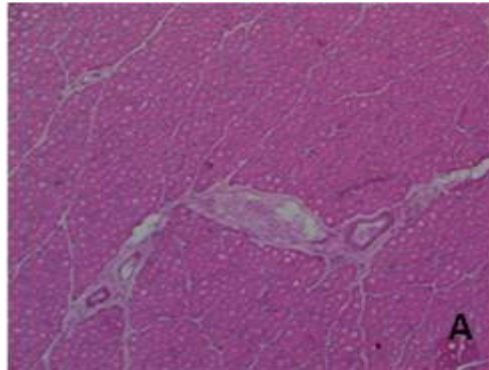


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

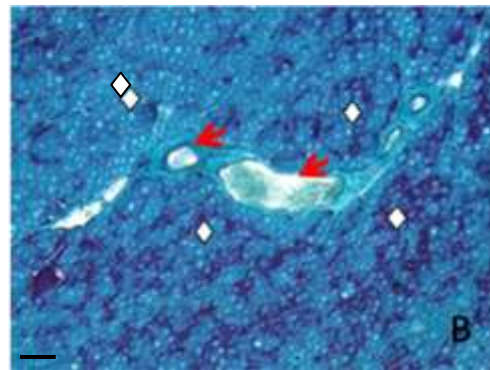
62. Isquemia de tres horas con reperusión de dos días (E29) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observa aumento en los espacios en la región superior del campo microscópico, los cuales se tornan más amplios en la región inferior. La predominancia en las dos regiones es de fibras oxidativas o tipo I. Bar: 100 micras.

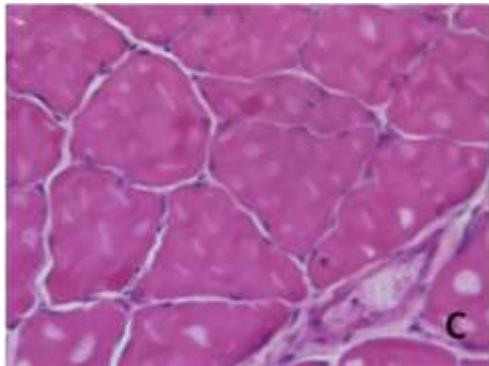
Imagen C. Imagen D. Se aprecia predominancia de fibras tipo I y de fibras intermedias o tipo IIA. La reacción a la tinción se observa más fuerte en las fibras de menor tamaño. Bar: 25 micras.



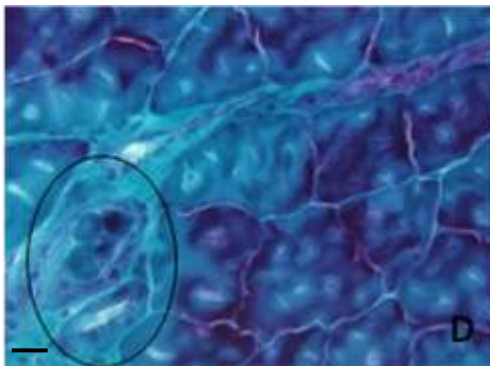
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



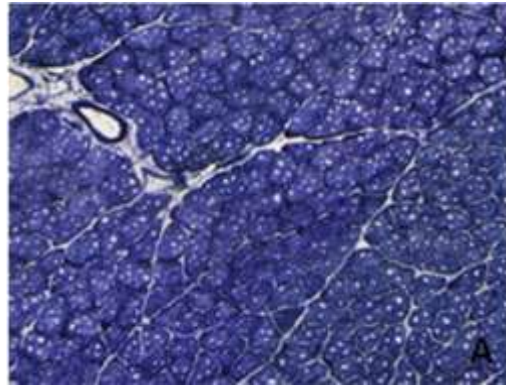
Tricrómica de Gomori modificada 40x

63. Isquemia de tres horas con reperfusión de dos días (E29) de músculo sóleo izquierdo

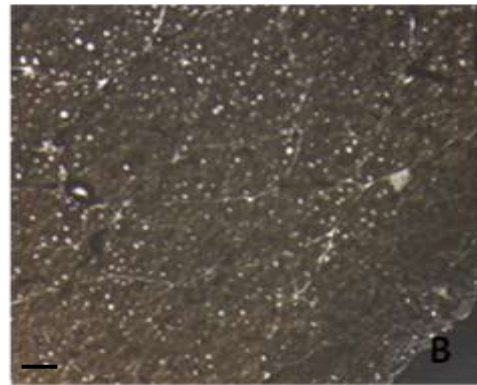
Imagen A. Imagen B. Se aprecian fascículos musculares definidos por el perimisio (rombos en B), en el que se observa vasos sanguíneos de mediano calibre (flechas). El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que conforma el perimisio se encuentra aumentado. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se observan miocitos con forma hexagonal, tamaños uniformes, sus núcleos se localizan periféricamente y rodeados por el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio. El espacio que ocupa el conectivo entre las fibras se encuentra levemente aumentado. Detállese el huso muscular acompañado de un vaso sanguíneo (círculo en D). Bar: 25 micras.

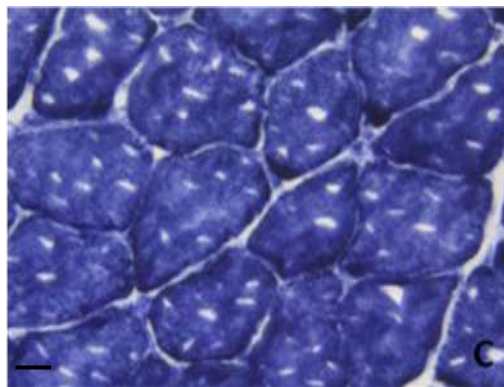
Fractura por congelación moderada.



Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x

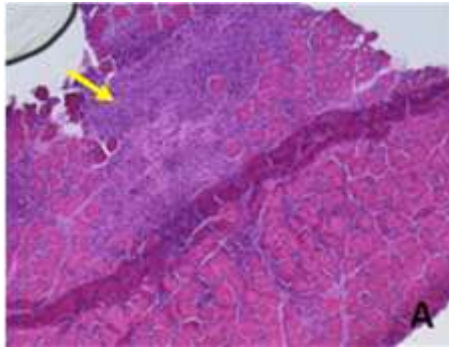


Tinción NADH-TR 40x

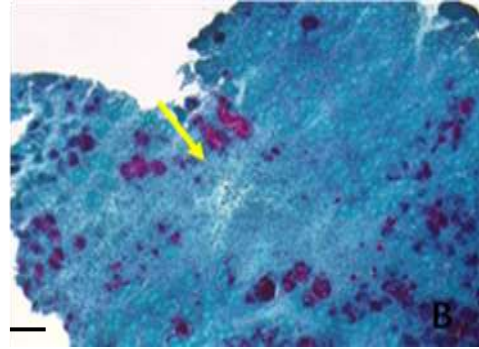
64. Isquemia de tres horas con reperfusión de dos días (E29) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados compuestos por fibras oxidativas o de contracción lenta. Bar: 100 micras.

Imagen C. Los miocitos presentan tamaños uniformes y elevada reactividad a la tinción. Bar: 25 micras.



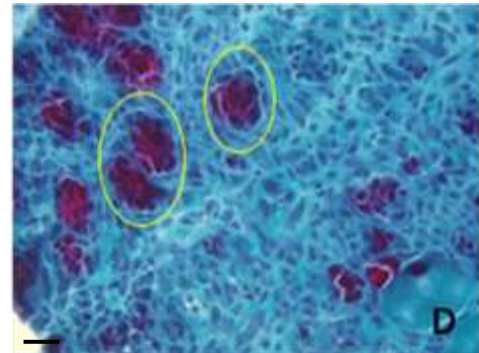
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

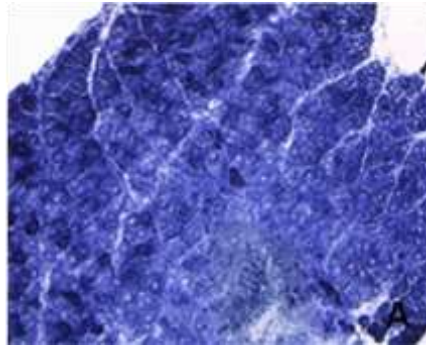


Tricrómica de Gomori modificada 40x

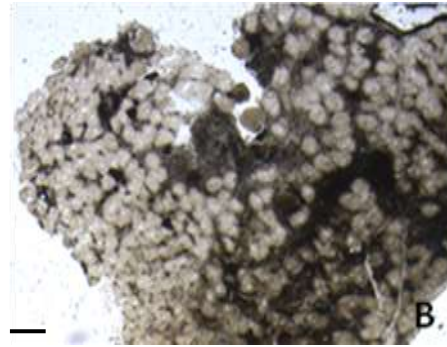
65. Isquemia de tres horas con perfusión de cuatro días (E31) de músculo extensor largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observa desorganización de los fascículos musculares con incremento de los espacios entre fibras y una elevada infiltración celular (flechas). Bar: 100 micras.

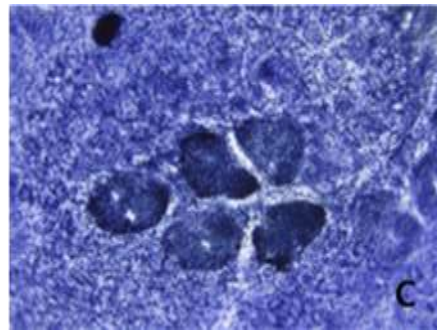
Imagen C. Imagen D. Las fibras se observan redondeadas, con tamaños uniformes y con núcleos periféricos; la infiltración celular en el endomisio es abundante. Se aprecian células pequeñas indiferenciadas que presentan citoplasma eosinófilo intenso, núcleo redondo y excéntrico, asociadas a otras células con características similares para constituir una estructura redondeada (círculos). Bar: 25 micras.



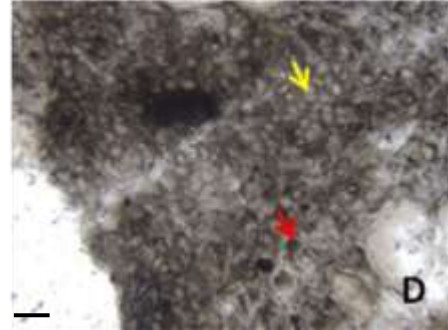
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

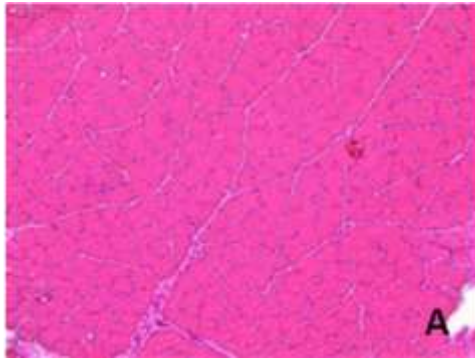


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

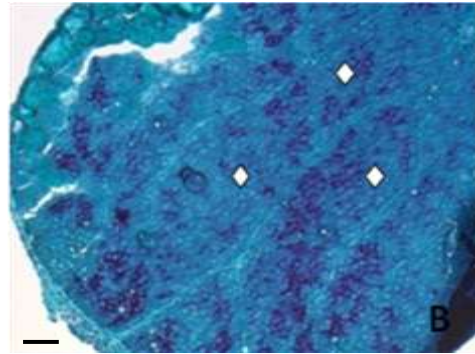
66. Isquemia de tres horas con reperfusión de cuatro días (E31) de músculo extensor largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Las regiones de infiltración celular reaccionan de manera intensa en ambas tinciones al igual que las fibras al interior de esta región; en el resto del campo microscópico se identifican fibras intermedias y oxidativas. Bar: 100 micras.

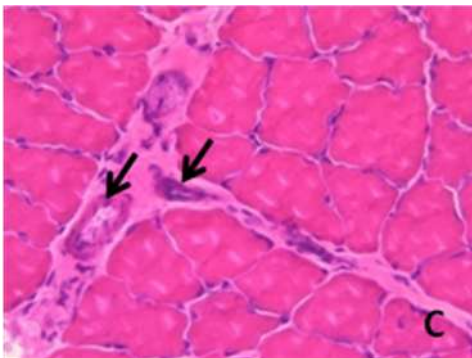
Imagen C. Imagen D. Se observan fibras oxidativas rodeadas por tejido conectivo. En tinción mATPasa se observan agregados celulares claros (flecha amarilla) y oscuros (flecha roja), al igual que fibras de contracción rápida o tipo IIB (región inferior derecha de la microfotografía). Bar: 25 micras.



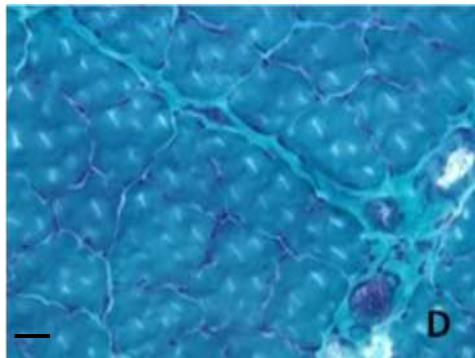
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



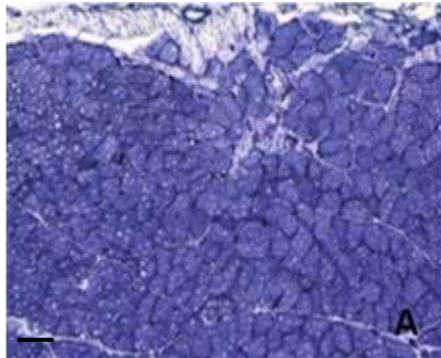
Tricrómica de Gomori modificada 40x

67. Isquemia de tres horas con reperfusión de cuatro días (E31) de músculo sóleo izquierdo

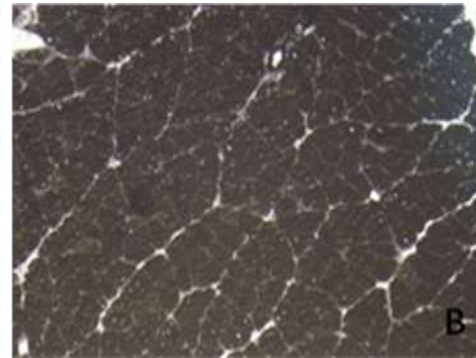
Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares delimitados por perimysio (rombos en B). El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma se encuentra levemente aumentado. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Los miocitos presentan formas hexagonales, tamaños uniformes, núcleos periféricos y tejido conectivo laxo que los rodea. Los espacios que ocupa el endomisio se encuentran levemente aumentados. Nótese los vasos sanguíneos de pequeño calibre en el conectivo (flechas en C). Bar: 25 micras.

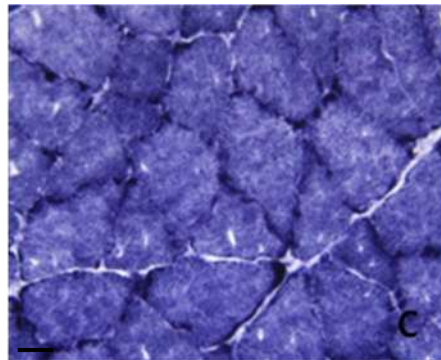
Fractura por congelación leve.



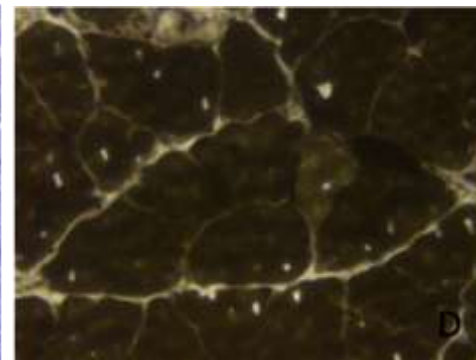
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

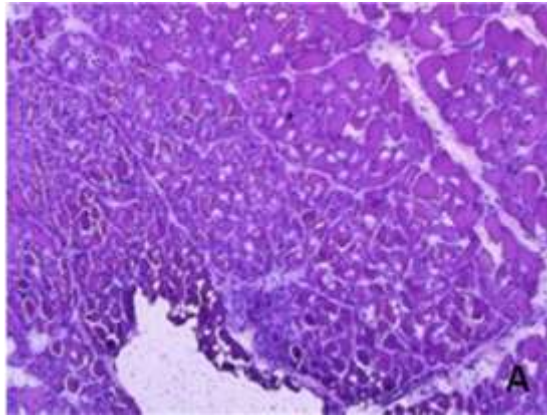


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

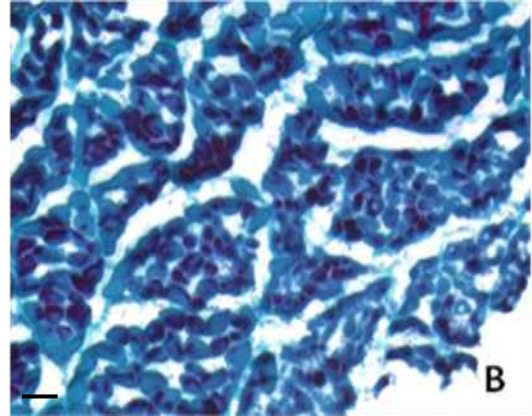
68. Isquemia de tres horas con perfusión de cuatro días (E31) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se aprecian fascículos musculares organizados, compuestos principalmente por fibras tipo I, oxidativas o de contracción lenta. Bar: 100 micras.

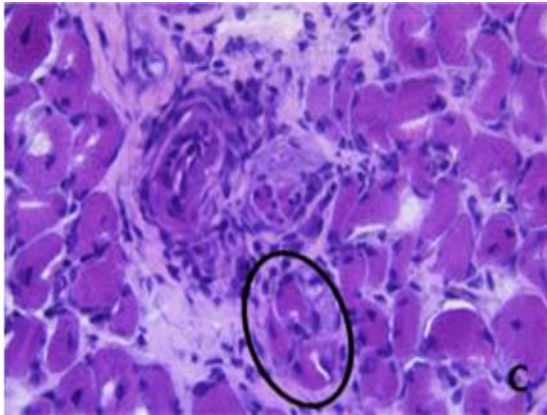
Imagen C. Imagen D. Predominancia oxidativa o de fibras de contracción lenta en ambas tinciones. Bar: 25 micras.



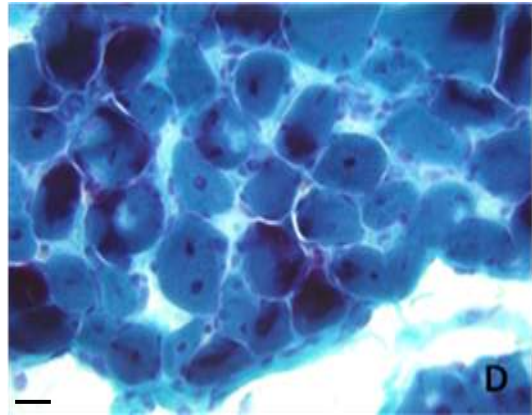
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

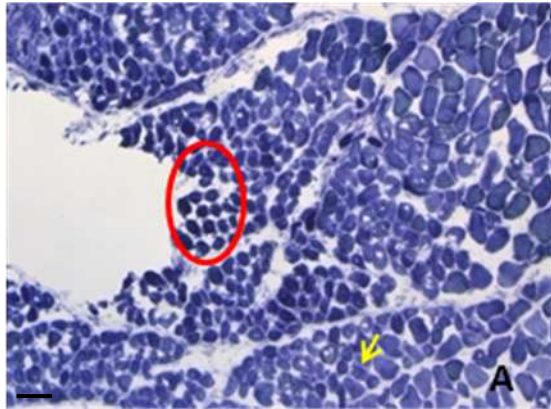


Tricrómica de Gomori modificada 40x

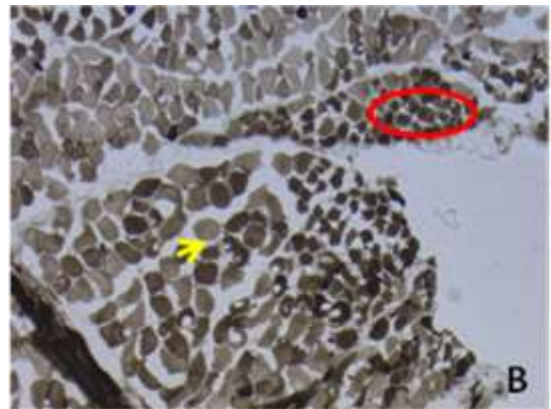
69. Isquemia de tres horas con reperusión ocho días (E33) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares desorganizados rodeados por tejido conectivo en el que se observa aumento del componente no fibrilar de la matriz extracelular. Bar: 100 micras.

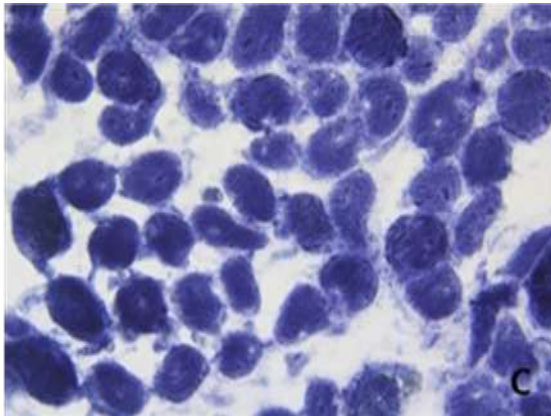
Imagen C. Imagen D. Se observan fibras pequeñas, redondas y con núcleos centrales. Se aprecia una asociación con el tejido conectivo para formar grupos de fibras musculares aún en proceso de diferenciación. El tejido conectivo que rodea tanto a los grupos de fibras como a los miocitos se observa moderadamente denso. Bar: 25 micras.



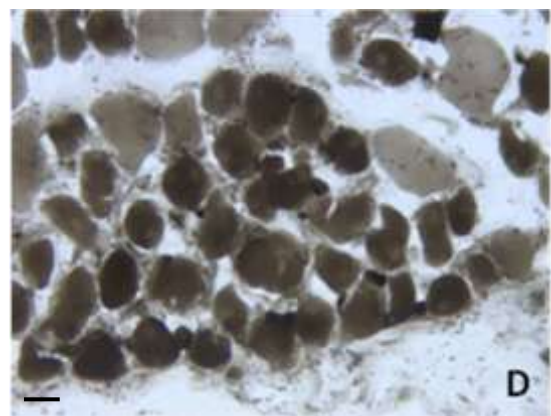
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

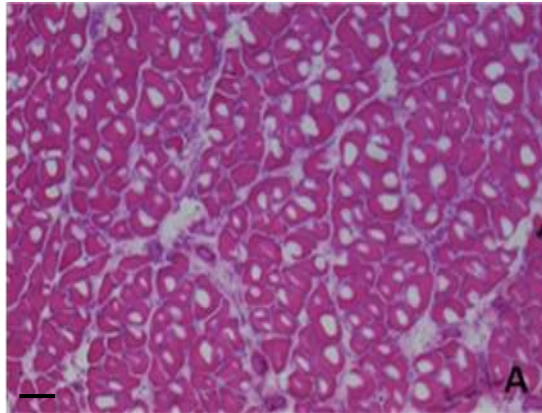


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

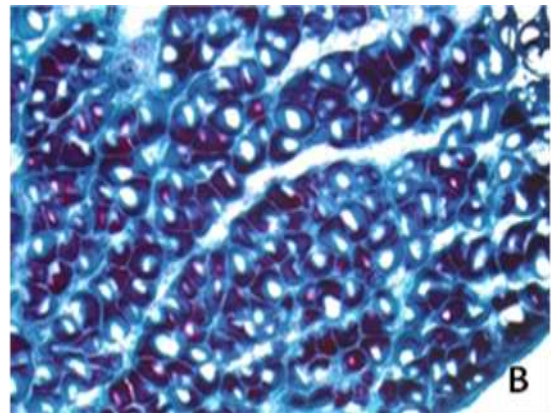
70. Isquemia de tres horas con reperusión ocho días (E33) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se aprecian fascículos musculares conformados por fibras pequeñas que presentan reactividad intensa similar a una fibra oxidativa (círculos); por otra parte, las fibras de mayor tamaño se aprecian como tipo IIA o intermedias (flechas). Bar: 100 micras.

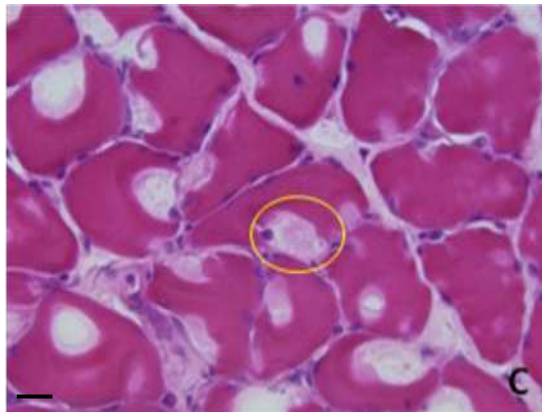
Imagen C. Imagen D. Predominancia oxidativa o de contracción lenta en fibras pequeñas y, tipo IIA en miocitos de mayor tamaño. Bar: 25 micras.



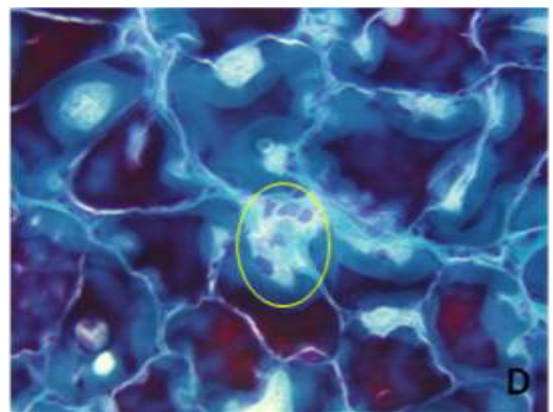
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

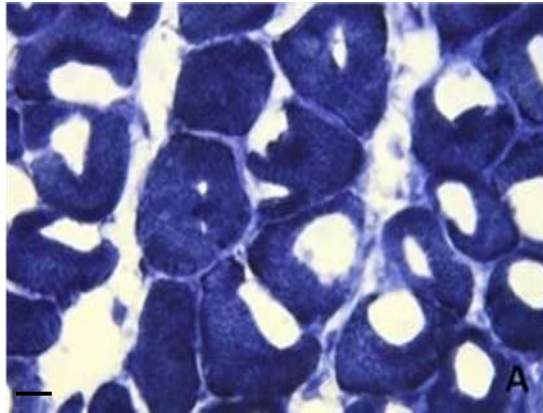


Tricrómica de Gomori modificada 40x

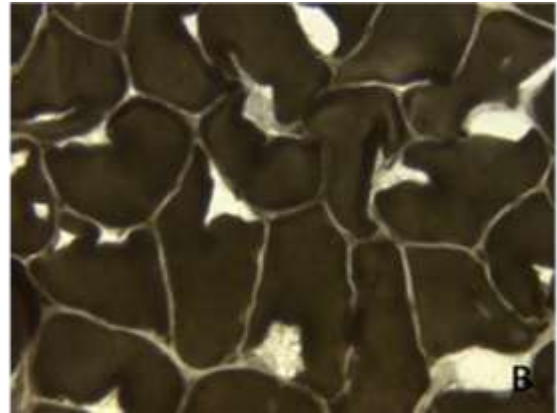
71. Isquemia de tres horas con reperfusión ocho días (E33) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares desorganizados con amplios espacios ocupados por el tejido conectivo moderadamente denso que conforma el perimisio. Es evidente la considerable infiltración celular. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se observan miocitos hexagonales con tamaños uniformes y núcleos periféricos. El espacio que ocupa el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio se encuentra aumentado. La infiltración celular en el conectivo es moderada y al igual que en las fibras musculares (círculos). Bar: 25 micras.



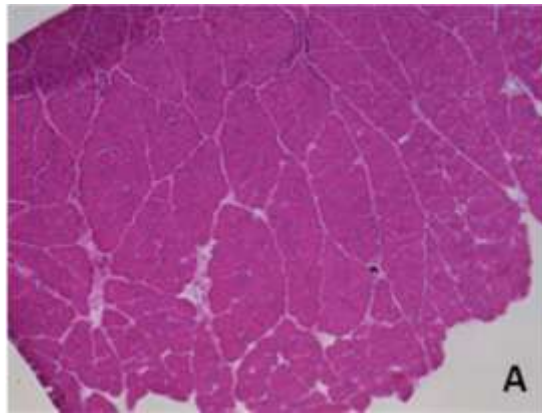
Tinción NADH-TR 40x



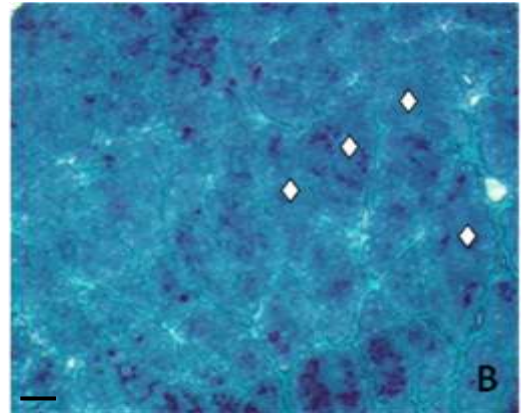
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

72. Isquemia de tres horas con reperusión ocho días (E33) de músculo sóleo izquierdo

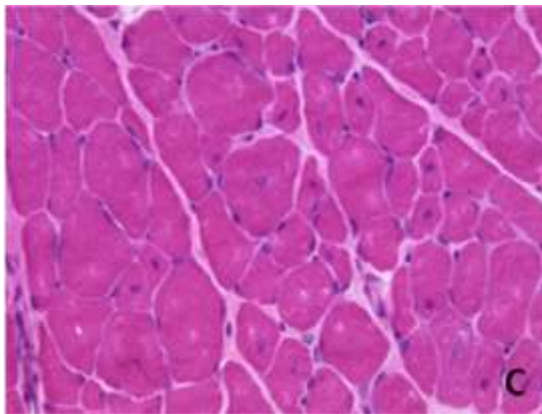
Imagen A. Imagen B. Se observa predominancia oxidativa o de fibras de contracción lenta en ambas tinciones. Los bordes de las fibras presentan reacción intensa. Bar: 25 micras.



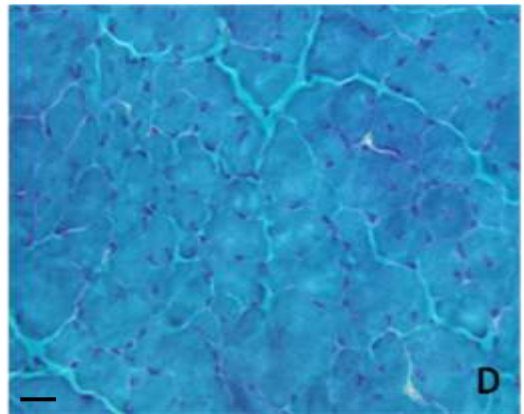
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

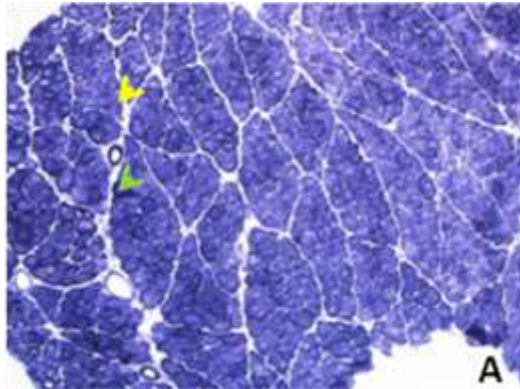


Tricrómica de Gomori modificada 40x

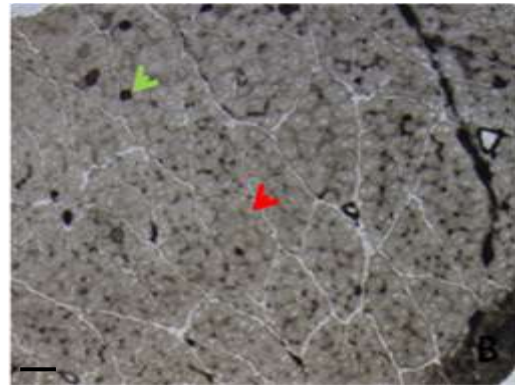
73. Isquemia de tres horas con reperusión de 16 días (E35) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares definidos delimitados por perimisio (rombos en B). Los espacios que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma se encuentran aumentados. Bar: 100 micras.

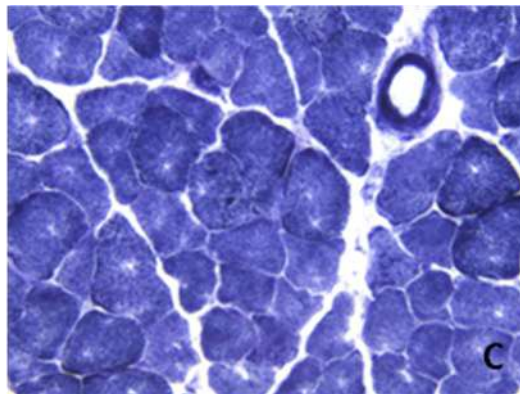
Imagen C. Imagen D. Predominan células musculares redondeadas y hexagonales, tamaños variables, las fibras pequeñas presentan núcleos centrales y en las restantes se localizan periféricamente. Los espacios entre miocitos se encuentran aumentados y está ocupado por tejido conectivo laxo que conforma el endomisio. Bar: 25 micras.



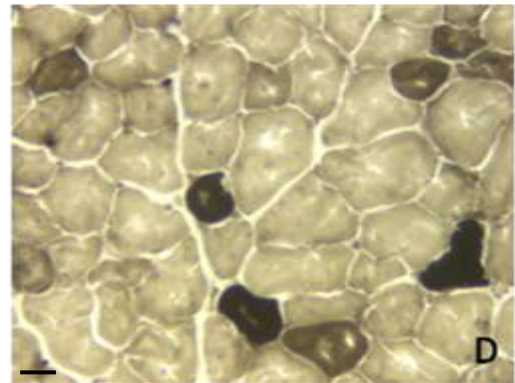
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

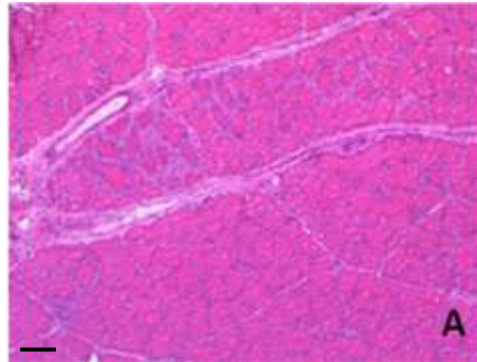


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

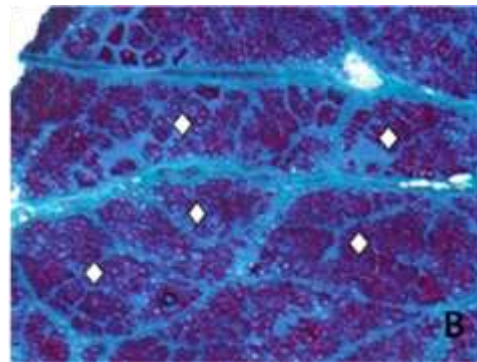
74. Isquemia de tres horas con reperusión de 16 días (E35) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Se observan fascículos musculares definidos delimitados por perimisio, los cuales se encuentran conformados por fibras de contracción intermedia o tipo IIA (flecha amarilla) y en menor cantidad fibras oxidativas o tipo I (flecha verde). Bar: 100 micras. **Imagen B.** Se aprecian fascículos musculares constituidos por fibras de contracción rápida o tipo IIB (flecha roja) y en poca proporción, fibras oxidativas o tipo I (flecha verde). Bar: 100 micras.

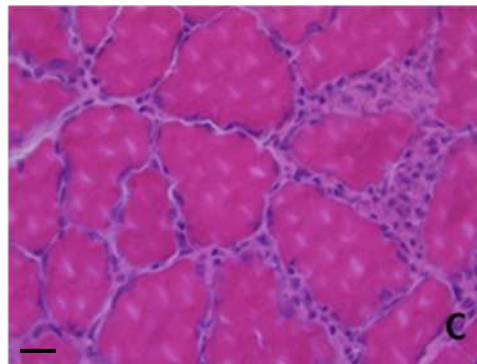
Imagen C. Imagen D. Se observan fibras con reacción intermedia a NADH-TR. Por otra parte, mATPasa, presenta un bajo número de fibras tipo I y una alta representación de fibras tipo IIB. Bar: 25 micras.



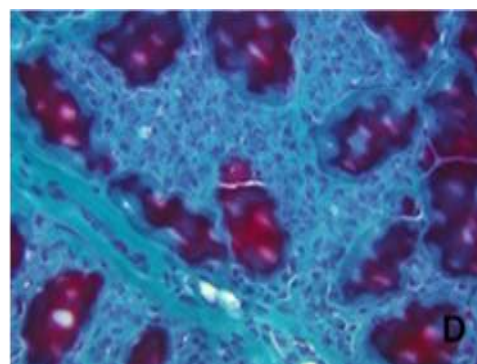
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x



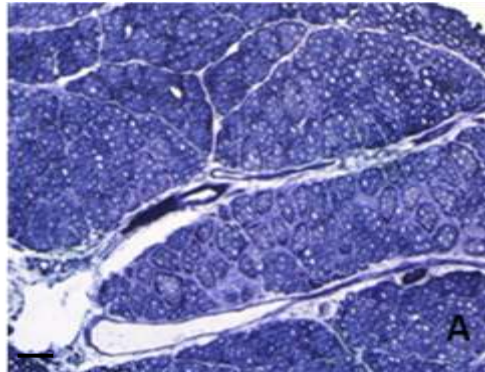
Tricrómica de Gomori modificada 40x

75. Isquemia de tres horas con reperfusión de 16 días (E35) de músculo sóleo izquierdo

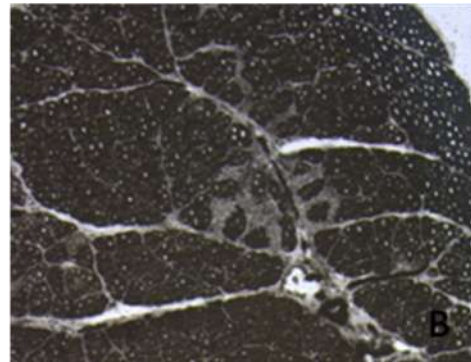
Imagen A. Imagen B. Se observa fascículos musculares definidos por perimysio (rombos en B), en el cual se observa abundante infiltración celular y aumento en el espacio que ocupa. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos con forma hexagonal, bordes irregulares o festoneados, tamaños variables y con núcleos periféricos, que se encuentran rodeados por tejido conectivo laxo en el que se observa una elevada infiltración celular. El espacio que ocupa el endomisio entre las fibras se encuentra aumentado. Bar: 25 micras.

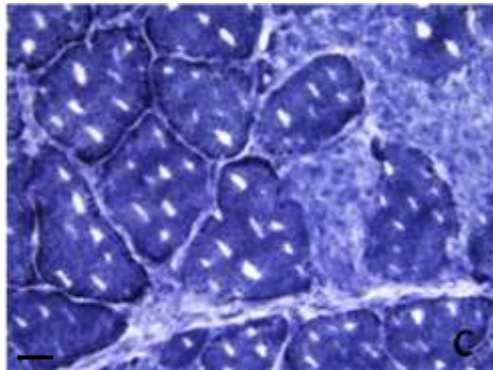
Fractura por congelación leve.



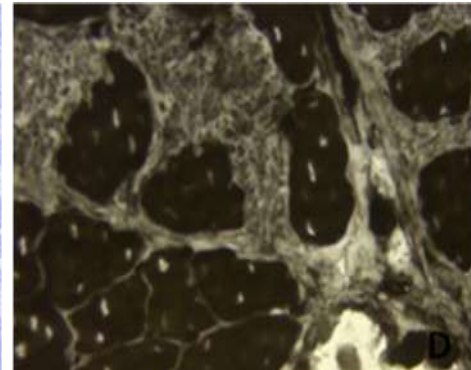
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



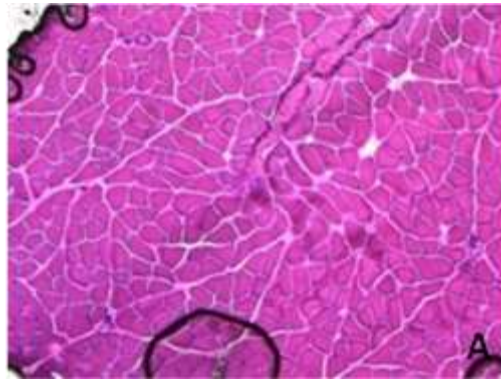
Tinción mATPasa pH 4.6 40x

76. Isquemia de tres horas con perfusión de 16 días (E35) de músculo sóleo izquierdo

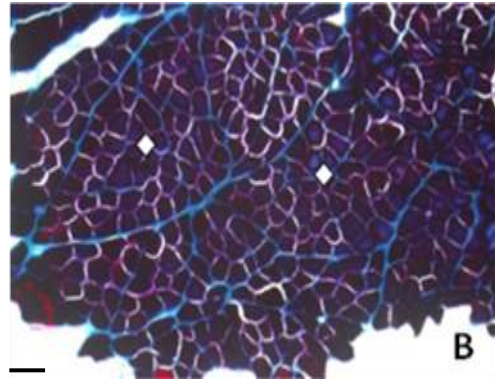
Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares definidos por el perimisio, lo cuales presentan predominancia de fibras oxidativas o de contracción lenta. Los espacios entre fascículos se encuentran aumentados dado por la elevada infiltración celular presente en el tejido conectivo. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se observan miocitos hexagonales que presentan reacción oxidativa o de contracción lenta y se encuentran rodeados por endomisio. Se observa aumento en los espacios entre fibras musculares. Bar: 25 micras.

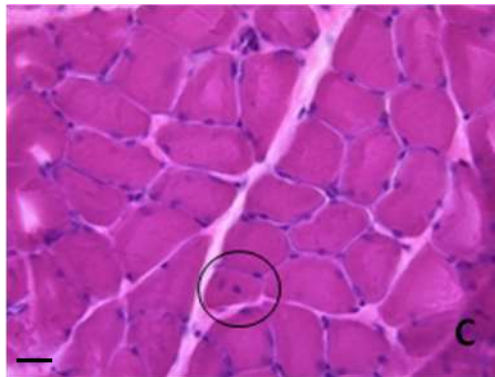
Fractura por congelación moderada.



Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x

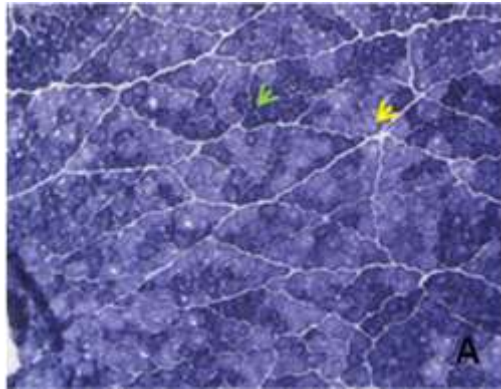


Hematoxilina- eosina 40x

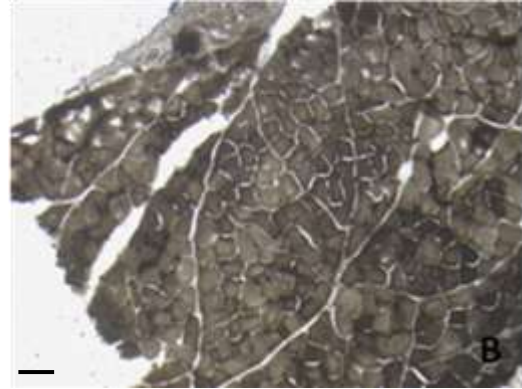
77. Isquemia de tres horas con reperusión de 24 días (E37) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se aprecian fascículos musculares definidos por el perimisio (rombos en B). Los espacios que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma, se encuentran aumentados. Bar: 100 micras.

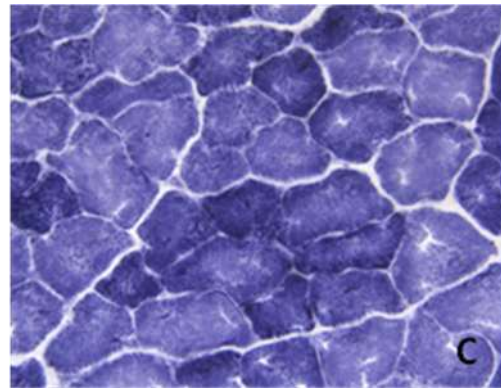
Imagen C. Se observan miocitos con forma hexagonal, uniformidad en los tamaños y núcleos periféricos. Nótese una célula con núcleo central (círculo). El espacio que ocupa el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio se encuentra levemente aumentado. 25 micras.



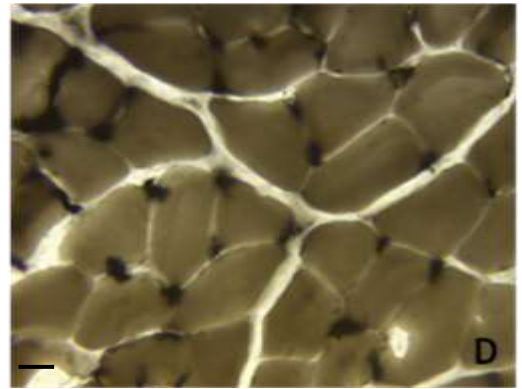
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x

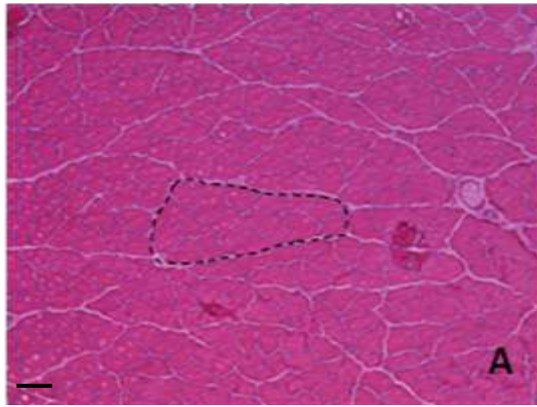


Tinción mATPasa pH 4.6 40x

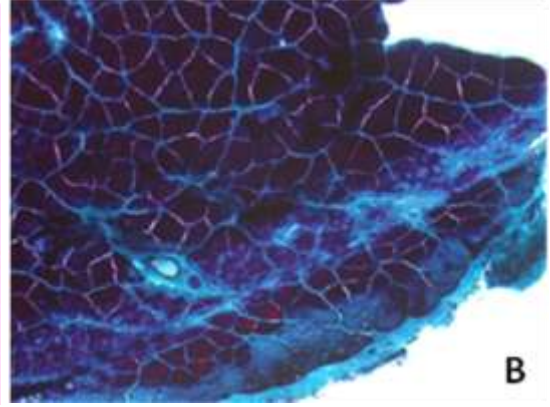
78. Isquemia de tres horas con reperusión de 24 días (E37) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares definidos por el perimisio, conformados por fibras de contracción intermedia o tipo IIA y escasas fibras oxidativas, de contracción lenta o tipo IIB. Bar: 100 micras.

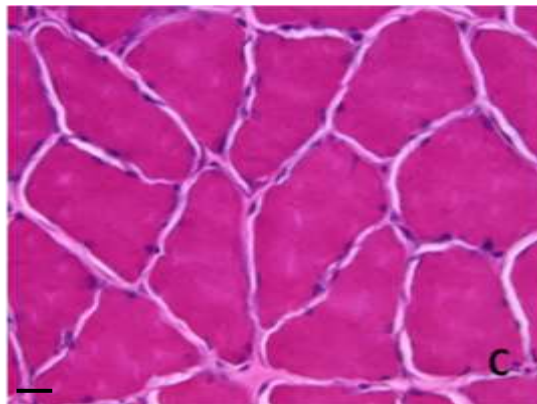
Imagen C. Imagen D. Se aprecia predominancia de fibras de contracción intermedia y pocas fibras tipo I. Bar: 25 micras.



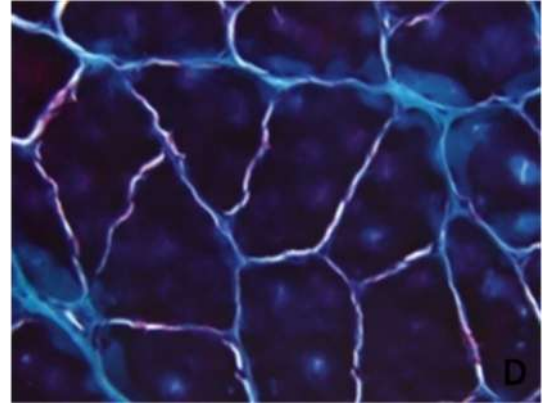
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

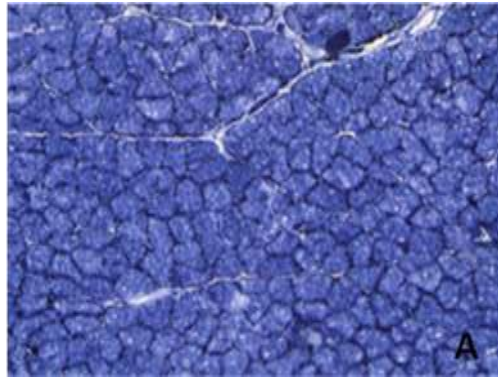


Tricrómica de Gomori modificada 40x

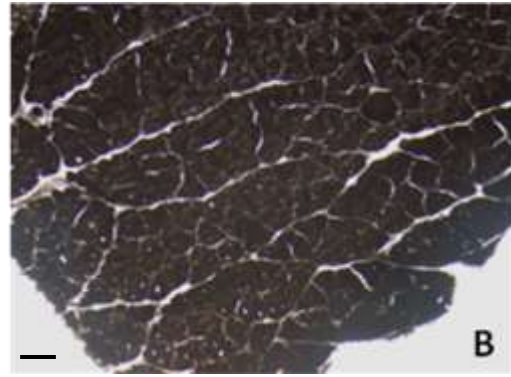
79. Isquemia de tres horas con reperusión de 24 días (E37) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados por el tejido conectivo moderadamente denso que conforma el perimisio (línea punteada en A). El espacio que ocupa el conectivo se encuentra levemente aumentado. Bar: 100 micras.

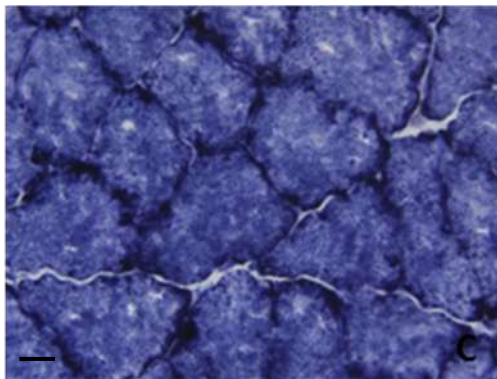
Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos esqueléticos con forma hexagonal, tamaños uniformes y núcleos periféricos. El espacio que ocupar el tejido conectivo laxo que conforma el endomisio se encuentra levemente aumentado y presenta abundante capilarización. Bar: 25 micras.



Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



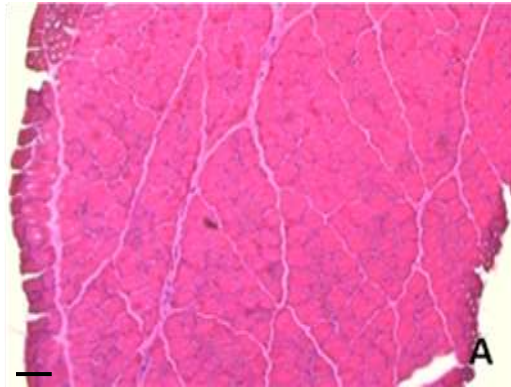
Tinción NADH-TR 40x

80. Isquemia de tres horas con reperusión de 24 días (E37) de músculo sóleo izquierdo

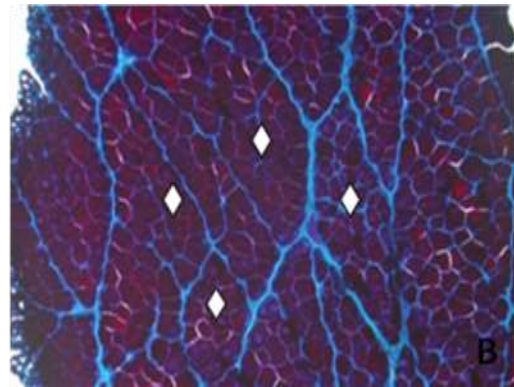
Imagen A. Imagen B. Se aprecian fascículos musculares definidos conformados por fibras oxidativas o de contracción lenta. Bar: 100 micras.

Imagen C. Se observa miocitos hexagonales con reacción oxidativa a la tinción. Bar: 25 micras.

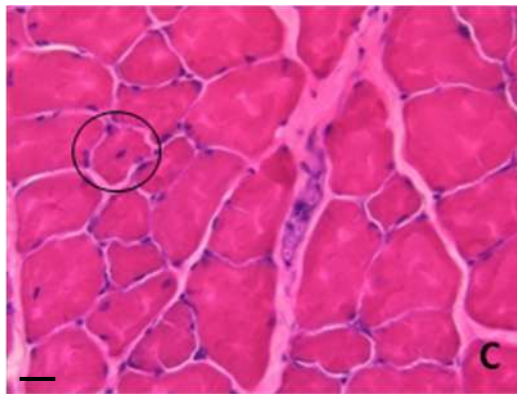
Fractura por congelación leve.



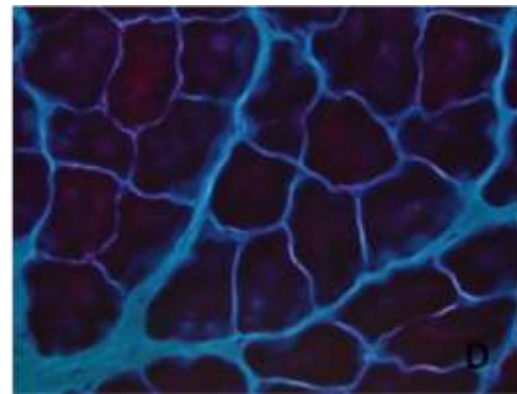
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

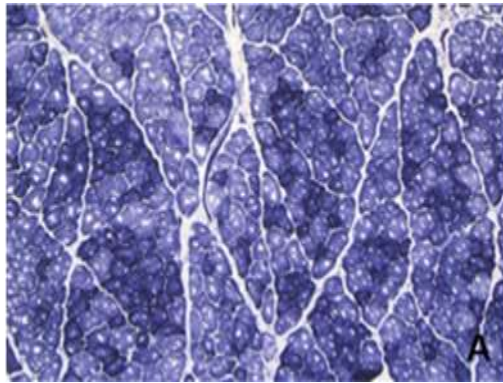


Tricrómica de Gomori modificada 40x

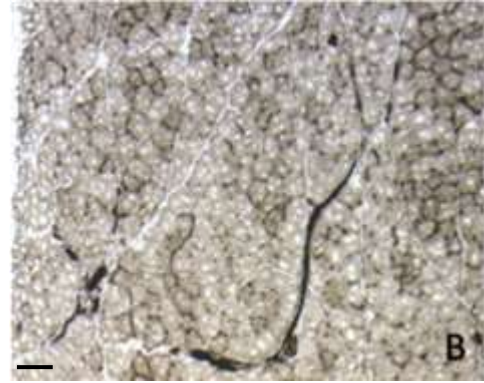
81. Isquemia de tres horas con reperusión de 32 días (E39) de músculo extensor radial longo del carpo derecho

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares organizados por el perimysio (rombos en B). El espacio que ocupa el tejido conectivo moderadamente denso que lo conforma se encuentra levemente aumentado. Bar: 100 micras.

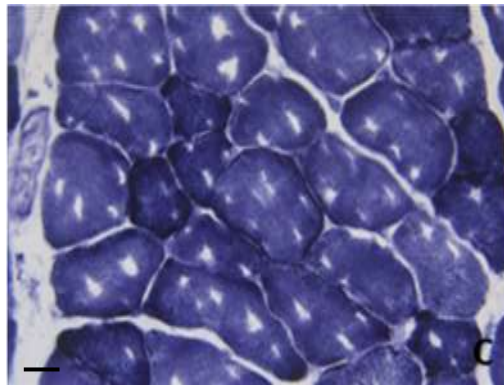
Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos hexagonales que presentan elevada variación en sus tamaños. Las fibras más pequeñas presentan núcleos centrales a diferencia de las grandes con núcleos periféricos. El tejido conectivo laxo que conforma el endomisio ocupa un espacio levemente aumentado entre las fibras. Bar: 25 micras.



Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



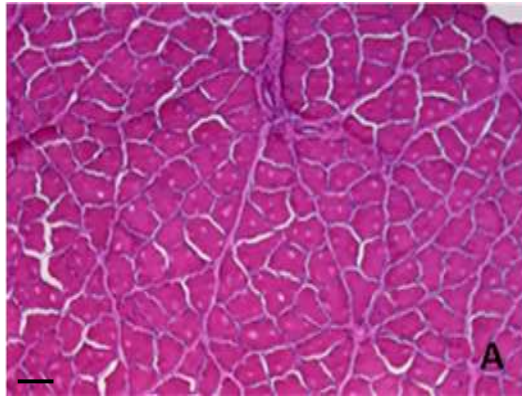
Tinción NADH-TR 40x

82. Isquemia de tres horas con reperusión de 32 días (E39) de músculo extensor radial largo del carpo derecho

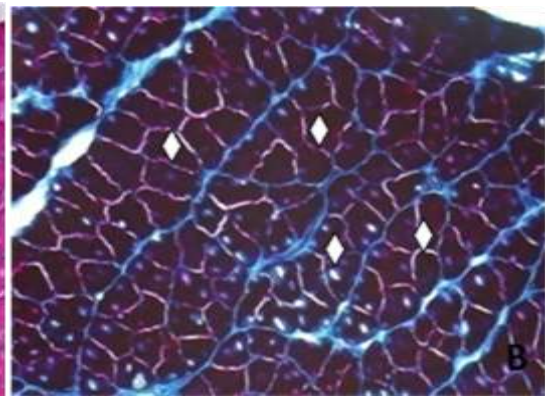
Imagen A. Imagen B. Se aprecian fascículos musculares organizados en los que es posible observar fibras con reacción oxidativa e intermedia a NADH. En B el predominio es de fibras tipo IIA y IIB. Bar: 100 micras.

Imagen C. Se observan miocitos hexagonales con tamaños variables y reacción oxidativa.

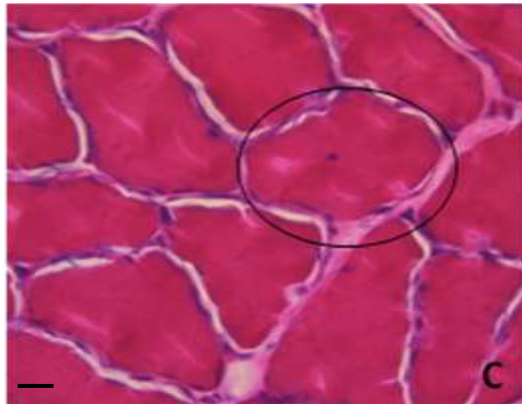
Fractura por congelación moderada. Bar: 25 micras.



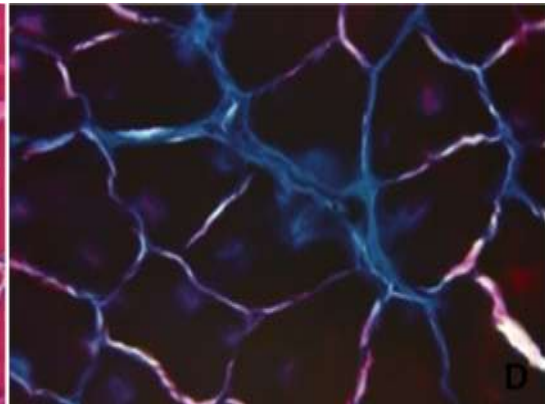
Hematoxilina- eosina 10x



Tricrómica de Gomori modificada 10x



Hematoxilina- eosina 40x

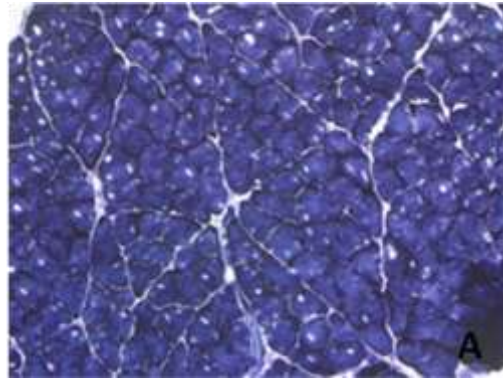


Tricrómica de Gomori modificada 40x

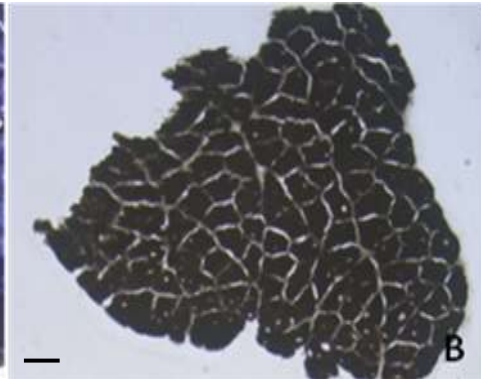
83. Isquemia de tres horas con reperusión de 32 días (E39) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares definidos por el tejido conectivo moderadamente denso que conforma el perimisio (rombos en B). El espacio que ocupa se encuentra levemente aumentado. Bar: 100 micras.

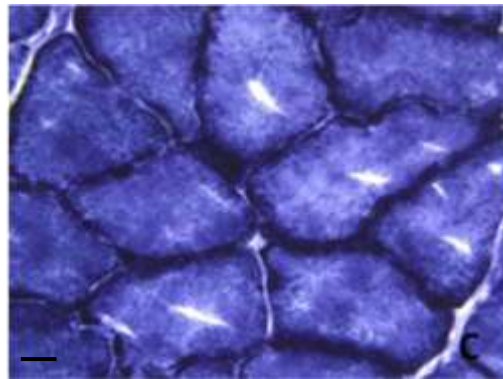
Imagen C. Imagen D. Se aprecian miocitos hexagonales con tamaños uniformes y núcleos periféricos en su mayoría. Nótese una fibra con núcleo central (círculo en C). El tejido conectivo laxo que conforma el endomisio ocupa un espacio levemente aumentado entre las fibras. Se observa abundante capilarización. Bar: 25 micras.



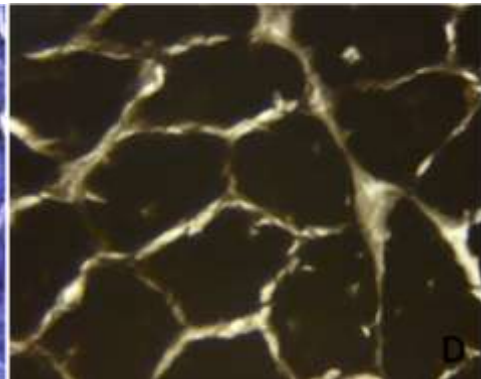
Tinción NADH-TR 10x



Tinción mATPasa pH 4.6 10x



Tinción NADH-TR 40x



Tinción mATPasa pH 4.6 40x

84. Isquemia de tres horas con reperfusión de 32 días (E39) de músculo sóleo izquierdo

Imagen A. Imagen B. Se observan fascículos musculares definidos conformados por fibras oxidativas, tipo I o de contracción lenta. Bar: 100 micras.

Imagen C. Imagen D. Se observan miocitos tipo I con forma hexagonal y tamaños uniformes. Bar: 25 micras.

Fractura por congelación leve.

14.2.

Registro de características del espécimen y procedimiento
Fecha
Nº de espécimen
Edad
Peso
Longitud cráneo-cola
Longitud cráneo-extremidad inferior
Longitud extremidad superior
Diámetro extremidad superior
Longitud extremidad inferior
Diámetro extremidad inferior
Temperatura del lugar
Humedad del lugar
Hora de inicio de la anestesia
Medicamentos administrados- Dosis
Hora de inicio de la presión para isquemia
Valor de la presión
Hora de finalización de la presión para isquemia
Tiempo
Hora de inicio de la reperusión
Duración del tiempo de reperusión
Hora de inicio de dosis letal
Medicamento administrado-Dosis
Hora de cese de signos vitales
Duración del procedimiento
Complicaciones y/o eventos presentados durante la realización del procedimiento

14.3. Procedimientos operacionales estándar (POEs)

14.3.1 POE para disección

 Departamento de Morfología	Procedimiento para disección de los músculos sóleo y extensor radial largo del carpo de rata Wistar, sometidos a isquemia y reperusión.	SELLO SECO
Unidad: Histología		
REVISADO POR: Liliana Salazar M. Msc.		Fecha de creación dd mm aa
APROBADO POR:		Fecha Aprobación dd mm aa
REALIZADO POR: Doris Haydee Rosero S.		Fecha de Realización dd mm aa

Materiales

- Dos tijeras Metzembraum
- Dos pinzas Kelly curvas
- Dos pinzas Kelly rectas
- Mango de bisturí n° 4
- Dos pinzas de disección sin garra
- Guantes, tapabocas, bata

Procedimiento

Tanto la disección como la medición se llevaron a cabo sobre una bandeja seca colocada sobre otra de mayor profundidad con hielo en su interior. Esto con el fin de conservar las propiedades histoquímicas de la muestra, tales como actividad

enzimática, niveles de glucógeno y los cambios inducidos por isquemia-reperusión.

La técnica de disección del músculo sóleo consistió en una incisión mediana posterior por encima del sitio de flexión de la articulación de la rodilla hasta el inicio de la articulación del pie. Con tijera Metzembbaum se separó la piel y con bisturí n° 24 adaptado a su respectivo mango, se seccionó la aponeurosis de la pierna; al visualizar el gastrocnemio, se desinsertó y levantó. Fue necesario separar el tendón del sóleo del tendón del gastrocnemio. A su vez, se separó este músculo de su origen con el fin de exponer el músculo sóleo (Greene, 1955). El sóleo se levantó lentamente en su tendón de inserción a nivel del Tendón de Aquiles y en sentido proximal hasta su tendón de origen evitando halar o estirar el músculo. Una vez separado se coloca en un frasco pequeño, seco y marcado, el cual también es colocado en una nevera portátil con pilas congeladas. Se realiza la disección del músculo contralateral y se procede con la medición. Para la disección del músculo extensor radial largo del carpo, se realizó una incisión mediana en la región dorsal de la extremidad, por encima del sitio de flexión y hasta la articulación del carpo; enseguida se separó la piel y la fascia que recubre los músculos del plano superficial del antebrazo (Greene, 1955). El extensor radial se encuentra posterior y muy cercano al músculo braquiorradial, por lo cual, se hizo indispensable separar cada tendón muscular, seccionar el tendón de inserción del extensor radial a nivel del segundo metacarpiano y sin halar separarlo de su tendón de origen. Se sigue el mismo protocolo de colocación en frío antes de la medición.

Registro de medidas de los músculos disecados						
N° de espécimen	Sóleo			Extensor radial largo del carpo		
	Longitud	Peso	Diámetro	Longitud	Peso	Diámetro

14.3. 2. POE para tinción histoquímica convencional Hematoxilina - Eosina

	Procedimiento para determinación por hematoxilina-eosina, las características del tejido muscular estriado esquelético de rata Wistar, sometido a isquemia y reperfusión.	SELLO SECO
Unidad: Histología - Departamento de Morfología		
REVISADO POR: Liliana Salazar M. Msc.		Fecha de creación dd mm aa
APROBADO POR:		Fecha Aprobación dd mm aa
REALIZADO POR: Doris Haydee Rosero S.		Fecha de Realización dd mm aa

Introducción

Hematoxilina es un colorante que por ser catiónico o básico tiñe estructuras ácidas en tonos azul y púrpura, como es el caso de los núcleos celulares. En contraste, la eosina, colorante ácido, genera tinción de componentes básicos celulares en tonos de color rosa, como las proteínas del citoplasma. El mecanismo de acción consiste en una reacción química en la cual el colorante y las estructuras celulares se unen de acuerdo con su carácter ácido-base. Por consiguiente, hematoxilina una vez oxidada a hemateína, tiñe fuertemente el núcleo, específicamente, los ácidos nucleicos y son denominados basófilos o hematoxinófilos. Por el contrario, la polaridad negativa de la eosina le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva, entre ellos, organelas citoplasmáticas, fibra colágena y fibras musculares, los cuales son denominados acidófilos o eosinófilos. Su importancia en este protocolo radica en determinar la presencia de fibras musculares en corte transversal, localización de los núcleos y celularidad asociada tanto al músculo como al conectivo.

Objetivo

Establecer mediante tinción con hematoxilina-eosina las características del tejido muscular estriado esquelético al ser sometido a periodos cortos de isquemia y prolongados de perfusión

Procedimiento

Materiales

- Beakers de 50 ml
- Placas portaobjetos tratadas
- Placa cubreobjetos
- Coupling
- Criostato
- Estufa
- Nevera
- Guantes, tapabocas, bata

Muestra

Los músculos corresponden al extensor radial largo del carpo de la extremidad anterior derecha y al sóleo de la extremidad posterior izquierda de los animales sometidos a isquemia y perfusión. De cada uno se obtuvo tres fracciones previamente incluido en O.C.T (tissue-tek). Los bloques fijados por congelación en isopentano enfriado en nitrógeno líquido contienen la fracción de músculo esquelético. Estos se encuentran almacenados en refrigerador de -75°C desde el mes de marzo de 2012.

Las placas que contienen los cortes se encuentran también en congelador de -75°C. Cada placa tiene entre 6 a 8 cortes con un grosor de 16 micras cada uno. Estos cortes se encuentran distribuidos en la mitad superior de la placa y las fibras musculares tienen orientación transversal.

Los grupos control y experimentales aplican tanto para el músculo sóleo como para el extensor radial largo del carpo. Se cuenta con una placa para cada uno, en total 42 placas para realizar la tinción.

Reactivos

- | | |
|---------------------|-----------------|
| 1. Hematoxilina | 5. Alcohol 95% |
| 2. Eosina | 6. Alcohol 100% |
| 3. Alcohol absoluto | 7. Xilol |
| 4. Agua destilada | 8. Consulmount |

Preparación y tinción

Solución	Compuesto	Cantidad	Procedimiento de preparación Hematoxilina de Harris y Eosina	Procedimiento de tinción
A	Hematoxilina cristalizada	1 gr	Disolver solución B calentando suavemente. Añadir en caliente A y llevar a ebullición. Añadir 0,5 gr de óxido rojo de mercurio. Revolver hasta adquirir color púrpura.	Dejar en hematoxilina previamente filtrada durante cinco minutos
	Etanol absoluto	10 ml	Colocar en agua con hielo hasta enfriar. Luego filtrar y añadir 10 ml de de ácido acético glacial.	Lavar con agua de la llave durante 3 minutos
			Filtrar cada vez que se vaya a utilizar.	Colocar en eosina durante 2 minutos
B	Alumbre potásico o amónico	20 gr	Almacenar en frasco opaco bien cerrado.	Realizar los siguientes pasos de deshidratación y aclaramiento, cada uno de dos minutos:
	Agua destilada	200 ml		Alcohol 95% - Alcohol 95% - Alcohol 100% - Alcohol 100% - Xilol - Xilol
Eosina	Eosina Y	5 gr	Mezclar los componentes.	Resultados:
	Naranja G	1,8 gr	Agregar 350 ml de alcohol absoluto y luego 0.25 ml de ácido acético.	
	Fucsina ácida	0,6 gr	Filtrar cada vez que se vaya a utilizar	
	Agua destilada	150 ml		

14.3.3. POE para tinción histoquímica convencional Tricrómica de Gomori modificada

 Departamento de Morfología	Procedimiento para determinación por tinción tricrómica de Gomori modificada, las características del tejido muscular estriado esquelético de rata Wistar, sometido a isquemia y reperfusión.	SELLO SECO
Unidad: Histología		
REVISADO POR: Liliana Salazar M. Msc.		Fecha de creación dd mm aa
APROBADO POR:		Fecha Aprobación dd mm aa
REALIZADO POR: Doris Haydee Rosero S.		Fecha de Realización dd mm aa

Introducción

Mediante la técnica de histoquímica convencional de Tricrómica de Gomori modificada es posible visualizar con mayor precisión el endomisio, perimisio y epimisio, puesto que tiñe el tejido conectivo en color verde y los miocitos esqueléticos en color rojo. De la misma manera, acúmulos anormales se tiñen rojizos o púrpura.

Objetivo

Establecer mediante tinción con hematoxilina-eosina las características del tejido muscular estriado esquelético al ser sometido a periodos cortos de isquemia y prolongados de reperfusión

Procedimiento

Materiales

- Beakers de 50 ml
- Placas portaobjetos tratadas
- Placa cubreobjetos
- Coupling
- Criostato
- Estufa
- Nevera
- Guantes, tapabocas, bata

Muestra

Los músculos corresponden al extensor radial largo del carpo de la extremidad anterior derecha y al sóleo de la extremidad posterior izquierda de los animales sometidos a isquemia y reperfusión. De cada uno se obtuvo tres fracciones previamente incluido en O.C.T (tissue-tek). Los bloques fijados por congelación en isopentano enfriado en nitrógeno líquido contienen la fracción de músculo esquelético. Estos se encuentran almacenados en refrigerador de -75°C desde el mes de marzo de 2012.

Las placas que contienen los cortes se encuentran también en congelador de -75°C. Cada placa tiene entre 6 a 8 cortes con un grosor de 16 micras cada uno. Estos cortes se encuentran distribuidos en la mitad superior de la placa y las fibras musculares tienen orientación transversal. Los grupos control y experimentales aplican tanto para el músculo sóleo como para el extensor radial largo del carpo. Se cuenta con una placa para cada uno, en total 42 placas para realizar la tinción. Para la estandarización se cuenta con 10 placas adicionales de control y diferentes períodos de isquemia, de las cuales se puede utilizar las que se requieran. Cada una de estas 10 placas tiene 5 cortes.

Reactivos

- | | |
|--------------------------|-------------------|
| 1. Hematoxilina | 6. Agua destilada |
| 2. Fast green | 7. Alcohol 95% |
| 3. Chromotrope 2R | 8. Alcohol 100% |
| 4. Acido fosfotungstico | 9. Xilol |
| 5. Acido acético glacial | 10. Consulmount |

Preparación y tinción

Solución	Compuesto	Cantidad	Procedimiento de preparación	de	Procedimiento de tinción
Hematoxilina de Harris			Igual preparación		Colocar en hematoxilina de Harris durante 5 minutos Lavar tres veces en agua destilada
Tricrómica	Fast green	0,3 gr	Mezclar uno a uno los compuestos		Colocar en la solución Tricrómica durante 20 minutos
	Chromotrope 2R	0,6 gr	Agitarse antes de usarse		Colocar en ácido acético al 2% dos tips.
	Acido fosfotungstico	0,3 gr			Deshidratación y aclaramiento, cada uno de 2 minutos: Alcohol 95% - Alcohol 95% - Alcohol 100% - Alcohol 100% - Xilol - Xilol
	Acido acético glacial	1 ml			Resultados:
	Agua destilada	100 ml			Tejido conectivo: verde
					Fibras musculares: rojo

POE 14.3. 4. POE para tinción histoquímica enzimática NADH-TR

 Departamento de Morfología	Procedimiento para determinación por tinción NADH-TR, las características del tejido muscular estriado esquelético de rata Wistar, sometido a isquemia y reperusión.	SELLO SECO
Unidad: Histología		
REVISADO POR: Liliana Salazar M. Msc.		Fecha de creación dd mm aa
APROBADO POR:		Fecha de Aprobación dd mm aa
REALIZADO POR: Doris Haydee Rosero S.		Fecha de Realización dd mm aa

Introducción

La enzima NADH-TR (nicotinamida adenina dinucleotido tetrazolium reductasa) se encuentra localizada en la membrana interna mitocondrial y hace parte de la cadena de transporte de electrones en la cual el NAD⁺ es reducido para formar NADH. La aplicación del método de NADH TR en los estudios de tejido muscular esquelético permite la diferenciación de varios tipos de fibras metabólicamente distintas (Hebling et al., 2009). En patología se utiliza ésta técnica para identificar cambios microvasculares, cambios en la estructura, organización de las fibras y modificaciones en el diámetro de la fibra como atrofia (Garcia del Moral, 1996).

El método de fijación por congelación es el más adecuado en la aplicación de este tipo de técnicas de histoquímica enzimática. Es de tener en cuenta que la conservación de las enzimas se logra si el tiempo que transcurre entre la obtención de la muestra y la fijación es menor a 2 horas (Hebling et al., 2009). De esta manera, al aplicar la tinción se hacen evidentes las fibras que utilizan

metabolismo oxidativo ya que presentan mayor reacción de color azul. Fibras lobuladas o apolilladas son frecuentes en miopatías de tipo inflamatorio.

Objetivo

Establecer mediante tinción histoquímica con NADH-TR, las características del tejido muscular estriado esquelético al ser sometido a periodos cortos de isquemia y prolongados de reperfusión

Procedimiento

Materiales

- Beakers de 50 ml
- Placas portaobjetos tratadas
- Placa cubreobjetos
- Coupling
- Criostato
- Estufa
- Nevera
- Guantes, tapabocas, bata

Muestra

Los músculos corresponden al extensor radial largo del carpo de la extremidad anterior derecha y al sóleo de la extremidad posterior izquierda de los animales sometidos a isquemia y reperfusión. De cada uno se obtuvo tres fracciones previamente incluido en O.C.T (tissue-tek). Los bloques fijados por congelación en isopentano enfriado en nitrógeno líquido contienen la fracción de músculo esquelético. Estos se encuentran almacenados en refrigerador de -75°C desde el mes de marzo de 2012.

Las placas que contienen los cortes se encuentran también en congelador de -75°C. Cada placa tiene entre 6 a 8 cortes con un grosor de 16 micras cada uno. Estos cortes se encuentran distribuidos en la mitad superior de la placa y las fibras musculares tienen orientación transversal.

Los grupos control y experimentales aplican tanto para el músculo sóleo como para el extensor radial largo del carpo. Se cuenta con una placa para cada uno, en total 42 placas para realizar la tinción. Para la estandarización se cuenta con 10 placas adicionales de control y diferentes períodos de isquemia, de las cuales se puede utilizar las que se requieran. Cada una de estas 10 placas tiene 5 cortes.

Reactivos

1. B- NADH
2. Nitro blue tetrazolium
3. Trizma Base
4. Acido clorhidrico
5. Agua destilada
6. Glicergel

Preparación y tinción

Solución	Compuesto	Cantidad	Procedimiento de preparación	de	Procedimiento de tinción	de
Tampón Tris 0.2 M	Trishidroximetilamino metano (trizma base)	0.3 gr	Mezclar Trizma base en agua destilada y luego agregar HCl.		Incubar las preparaciones en la solución B durante 45-60 minutos a 37°C. Chequear las placas.	
	Agua destilada	29 ml	Solución madre, almacenar en nevera. Ajustar pH		Lavar en agua destilada durante 1 minuto	
	0.1 M acido clorhídrico (0.86 ml / 100 ml)	21 ml	La NADH y la NBT deben permanecer en refrigeración. Antes de utilizarlas permitir aclimatación de ambos reactivos.		Realizar montaje con Glicergel.	
Solución de incubación NADH	Tampón Tris 0.2M (pH 7.4)	10 ml	Solución de trabajo, preparar en el momento de la tinción. Agregar ambos compuestos a la solución madre.		Resultados:	
	Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	10 mg	El pH debe estar en 7.2,		Fibras Oxidativas o tipo I: oscuras	
	B-nicotinamida dinucleótido	8 mg			Fibras glucolíticas o tipo II: claras	

POE 14.3. 5. POE para tinción histoquímica enzimática mATPasa a pH 4.6

 Departamento de Morfología	Procedimiento para determinación por tinción histoquímica de mATPasa a pH ácido, las características del tejido muscular estriado esquelético de rata Wistar, sometido a isquemia y reperfusión.	SELLO SECO
Unidad: Histología		
REVISADO POR: Liliana Salazar M. Msc.		Fecha de creación dd mm aa
APROBADO POR:		Fecha de Aprobación dd mm aa
REALIZADO POR: Doris Haydee Rosero S.		Fecha de Realización dd mm aa

Introducción

El análisis histoquímico de la actividad de la miosina ATPasa permite diferenciar entre las fibras musculares de contracción rápida y contracción lenta, puesto que la actividad de esta enzima se correlaciona con la velocidad de contracción muscular. Las fibras de contracción rápida hidrolizan ATP más rápido que las de contracción lenta, por lo cual presentan mayor reactividad. El método para aplicación de Miosina ATPasa permite determinar cambios estructurales en diferentes tipos de fibras (Martinsson et al., 2000).

Pre incubación en la solución inicial es importante antes de continuar con el proceso de incubación (Garcia del Moral, 1996). Latorre et. al, 1993, aplicaron cinco diferentes métodos para estudio de ATP asas en perros entre los cuales se encuentran: método uno (1) corresponde a la preincubación alcalina; método dos (2) está relacionado con la preincubación ácida utilizando acetato de sodio 0.2 M; método tres (3) y cuatro (4) corresponden a preincubación ácida utilizando acetato de sodio 0.1M. El método cinco (5) corresponde a la preincubación ácida utilizado

por Dubowitz & Brooke en 1973 (Latorre et al., 1993). La fijación es igual a NADH-TR. El protocolo aplicado, m-ATPasa con preincubación alcalina, fue el siguiente (Kalmar et al.), (Doolan, 2002).

Objetivo

Establecer mediante tinción histoquímica con mATPasa, las características del tejido muscular estriado esquelético al ser sometido a periodos cortos de isquemia y prolongados de perfusión

Procedimiento

Materiales

- | | |
|----------------------------------|---------------------------|
| -Beakers de 50 ml | -Estufa |
| -Placas portaobjetos
tratadas | -Nevera |
| -Placa cubreobjetos | -Guantes, tapabocas, bata |
| -Coupling | |
| -Criostato | |

Muestra

Los músculos corresponden al extensor radial largo del carpo de la extremidad anterior derecha y al sóleo de la extremidad posterior izquierda de los animales sometidos a isquemia y perfusión. De cada uno se obtuvo tres fracciones previamente incluido en O.C.T (tissue-tek). Los bloques fijados por congelación en isopentano enfriado en nitrógeno líquido contienen la fracción de músculo esquelético. Estos se encuentran almacenados en refrigerador de -75°C desde el mes de marzo de 2012.

Las placas que contienen los cortes se encuentran también en congelador de -75°C. Cada placa tiene entre 6 a 8 cortes con un grosor de 16 micras cada uno. Estos cortes se encuentran distribuidos en la mitad superior de la placa y las fibras musculares tienen orientación transversal.

Los grupos control y experimentales aplican tanto para el músculo sóleo como para el extensor radial largo del carpo. Se cuenta con una placa para cada uno, en total 42 placas para realizar la tinción. Para la estandarización se cuenta con 10 placas adicionales de control y diferentes períodos de isquemia, de las cuales se puede utilizar las que se requieran. Cada una de estas 10 placas tiene 5 cortes.

Reactivos

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| 1. Adenosin trifosfato | 2. Cloruro de cobalto |
|------------------------|-----------------------|

3. Cloruro de calcio
4. Sulfuro de amonio
5. Barbital sodico

6. Acetato de sodio
7. Agua destilada
8. Glicergel

Preparación y tinción

Solución	Compuesto	Cantidad	Procedimiento de preparación	de	Procedimiento de tinción
Barbital sódico 0.075 M	Barbital sódico	0.75 gr	Las soluciones de trabajo se preparan en el momento de la tinción. El pH se ajusta con NaOH 0.1N		Preincubar en solución ATP I
	Agua destilada	50 ml			Tiempo: 25 minutos – 22°C
					Incubar durante 40 minutos en la solución ATP II a 37 °C Cloruro de calcio 0.2 M. Dos baños de 5 minutos c/u. Colocar en cloruro de cobalto al 2% durante 5 minutos. Lavar con agua destilada
Cloruro de calcio 0.1M	Cloruro de calcio	0.36 gr			Sulfuro de amonio al 1% durante 15 segundos Lavar con agua destilada 5 min.
	Agua destilada	25 ml			
Acetato de sodio 0.07 M	Acetato de sodio	0.96 gr			Realizar montaje con Glicergel o deshidratación y aclaramiento y montaje con resina sintética
	Agua destilada	70 ml			
ATPasa buffer (ATP I)	Barbital sódico 0.075 M	50 ml	Ajustar pH 11.6		Resultados:
	Cloruro de calcio 0.1 M	25 ml	Solución de trabajo		
	Acetato de sodio 0.07 M	70 ml			
ATPasa buffer (ATP II)	ATP asa buffer (ATP I)	10 ml	Solución de trabajo,		Fibras tipo I: claras
	Adenosín 5´trifosfato	15 mg	Ajustar pH 10.6		Fibras tipo II: oscuras
Cloruro de calcio 0.2 M	Cloruro de calcio	0.72 gr			
	Agua destilada	25 ml			
Cloruro de cobalto 2%	Cloruro de cobalto	2 gr	Solución de trabajo		
	Agua destilada	100 ml			
Sulfuro de amonio 1%	Sulfuro de amonio	1 gr	Solución de trabajo,		
	Agua destilada	100 ml			

POE 14.3.6. POE para medición y pruebas de concordancia

 Departamento de Morfología	Protocolo de medición de imágenes de tejido muscular estriado esquelético sometido a periodos cortos de isquemia inducida y prolongados de reperfusión	SELLO SECO
Unidad: Histología		
REVISADO POR: Liliana Salazar M. Msc. Mario Alejandro Ortiz Msc. Liliana Flórez, Msc.		Fecha de creación dd mm aa
APROBADO POR:		Fecha de Aprobación dd mm aa
REALIZADO POR: Doris Haydee Rosero S.		Fecha de Realización dd mm aa

Introducción

Los métodos estadísticos de evaluación de la concordancia permiten determinar la fiabilidad, en este caso, de las mediciones de las observaciones entre expertos e investigadores y así, garantizar la reproducibilidad de los resultados al ser aplicados a muestras similares de tejido muscular. Para ello es fundamental contar con un protocolo de medición que incluya los parámetros a estudiar.

Objetivos

1. Establecer el protocolo de medición para imágenes obtenidas a partir de muestras provenientes de los músculos sóleo y extensor radial largo del carpo, sometidos a periodos cortos de isquemia y prolongados de reperfusión.
2. Establecer el grado de concordancia intra e interobservador en la medición de áreas de matriz extracelular intramuscular y fibras musculares esqueléticas, en 15 imágenes de músculos esqueléticos sometidos a isquemia y reperfusión.

Procedimiento

Materiales

- Software Image Pro Plus versión 7.0
- Computador de escritorio Dell
- Imágenes de tejido muscular estriado esquelético en aumentos 10x y 40x

Muestra

Los músculos corresponden al extensor radial largo del carpo, de la extremidad anterior derecha y al sóleo, de la extremidad posterior izquierda de biomodelos Wistar machos adultos, sometidos a isquemia y perfusión. Una vez se realiza el procesamiento histoquímico para los preparados histológicos, se adquirieron imágenes en aumentos de 10x y 40x, mediante microscopio óptico Leica adaptado a cámara y software LASV3.8.

Del total de imágenes se seleccionaron 483 microfotografías (figura 18) en las tinciones hematoxilina-eosina, NADH-TR, mATPasa 4.6 y Tricrómica de Gomori modificada, en ambos aumentos.

Para la determinación del grado de concordancia se seleccionaron 15 imágenes, entre ellas, las pertenecientes al grupo control e isquemia de una y tres horas con perfusión.

Parámetros de medición

En relación con la matriz extracelular intramuscular – en aumento 10x

En relación con las fibras musculares – en aumento 40x

Se cuenta con la observación de dos expertos y la observación del investigador. Las tres personas utilizarán las mismas microfotografías. Así mismo, cada observador deberá realizar dos mediciones en diferentes momentos.

Parámetros estadísticos

Con base en las mediciones del total de las imágenes seleccionadas, se procede a calcular:

Variabilidad interobservador

Variabilidad intraobservador

Variabilidad dada por el instrumento de medida

Coeficiente de correlación intraclass para las variables continuas, que corresponden a las demás establecidas en el instrumento.

Técnica de medición

1. Calibración (ya se encuentra establecida para 10x y 40x)

Antes de iniciar las mediciones, en especial las correspondientes a áreas, el observador debe verificar que las calibraciones se encuentran correctas. Para ello, abrir la carpeta denominada reglilla y la imagen correspondiente a reglilla en el aumento de 10x. En la barra de menú: Click en Measure: Calibration: Spatial: Name: Isq&Rep10x: System: Apply: Close. Con esto queda seleccionado el tipo de calibración a utilizar (**figuras 1 y 2**). Los valores que deben aparecer en X y Y, son los evidenciados en la **figura 3**.

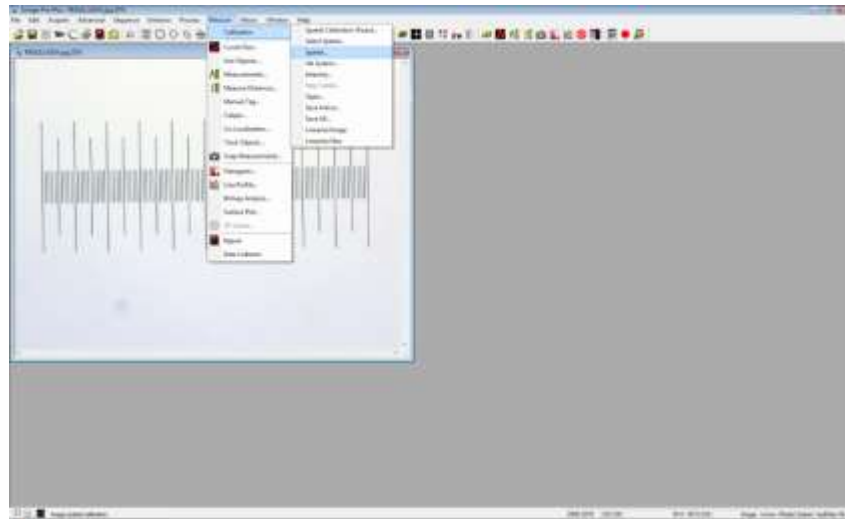


Figura 1. Ruta de acceso al cuadro de diálogo para la verificación de la calibración.

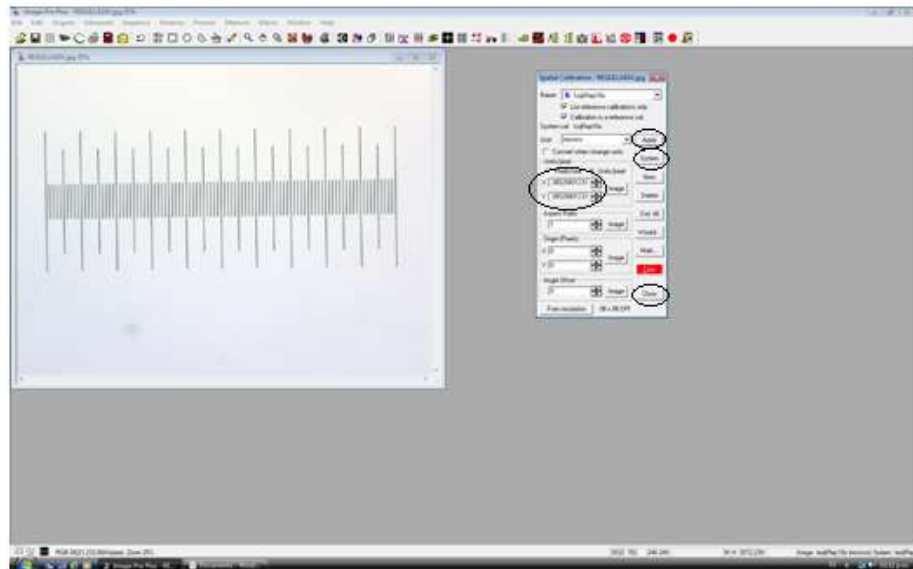


Figura 2. Cuadro de diálogo Selección de la calibración.

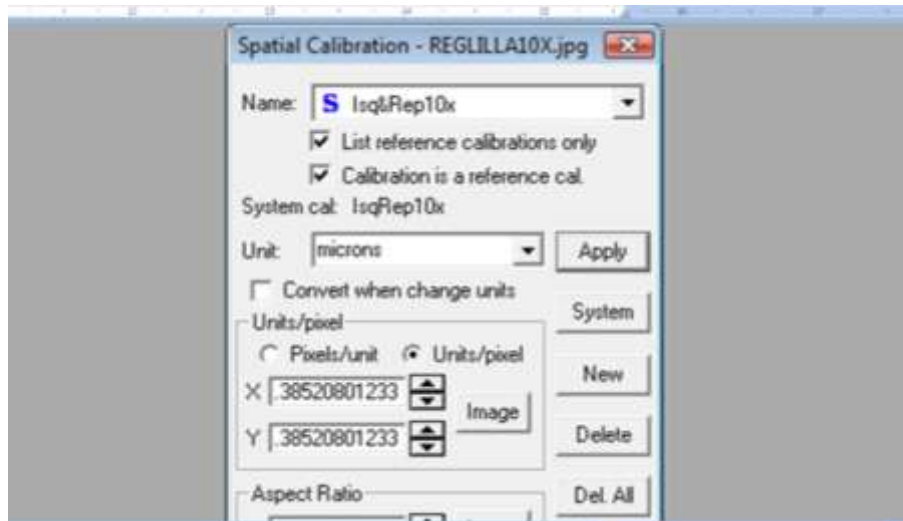


Figura 3. En la medición de cada imagen se debe verificar que los valores de X y Y sean iguales a los que se encuentran en esta imagen.

Luego, para verificar que las mediciones a realizar son correctas, dar click en el

ícono  (distancias), localizado en la barra de herramientas. Seleccionar el color y proceder a medir un segmento determinado en la reglilla. El resultado de la medición debe ser preciso y estar acorde al aumento en el que se encuentra la imagen. El segmento completo mide 1 mm, es decir, 1000 micras. Por tanto cada subdivisión pequeña mide 0.01 mm, igual a 10 micras (**figura 4**).

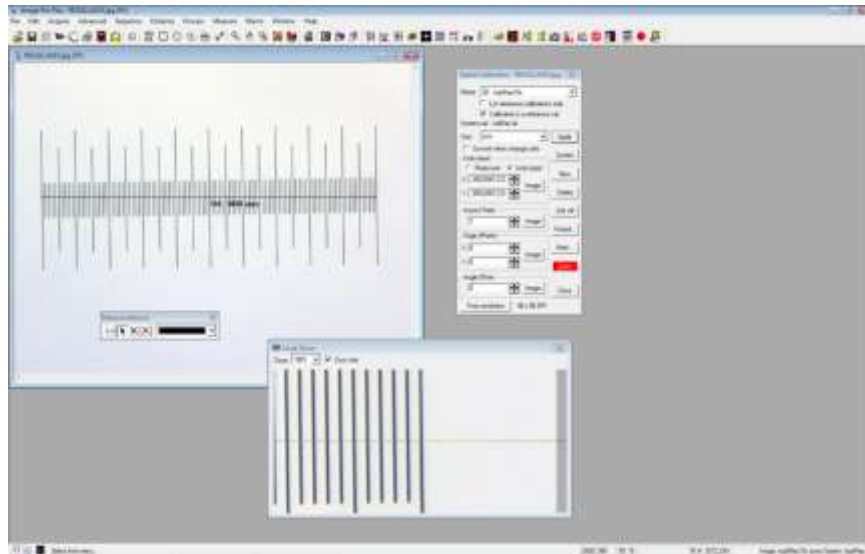


Figura 4. Comprobación de la exactitud de la calibración. Sobre la imagen, click derecho, la opción *local zoom* permite un acercamiento a la región que se pretende medir.

El mismo procedimiento debe realizarse con el aumento de 40x, es decir, selección de la calibración, verificación de los valores y prueba de medición en la imagen de la reglilla en 40x (**figura 5**).

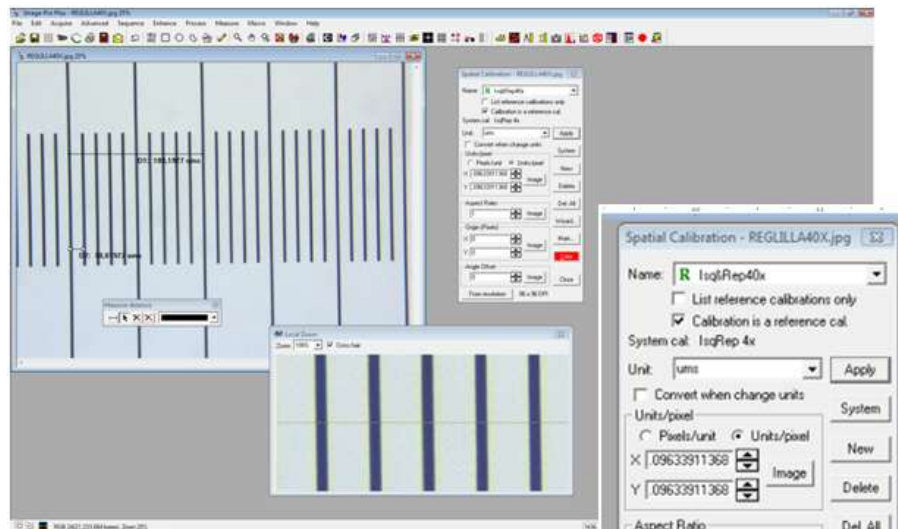


Figura 5. Selección de la medición y comprobación de la calibración en aumento 40X.

La medición en la reglilla solo se realiza al inicio de la sesión; por otra parte, la selección de la calibración, se debe realizar con cada imagen en la que se va a trabajar.

2. Conteo semiautomático:

El software permite realizar conteo semiautomático de tipos de fibras con las características a evaluar. El conteo completamente automático tiene la desventaja de ser inexacto debido a la estrecha relación entre las fibras musculares con el tejido conectivo. La separación de la imagen en los canales de color RGB (red, green, blue), es útil para resaltar características que facilitan el conteo.

Realizar click en barra de menú: Process: color channel: en el cuadro de diálogo click en aceptar.

Seleccionar la imagen que mejor presenta las estructuras a medir, esta corresponde al canal verde. Descartar las demás. Otra forma es, en el cuadro de diálogo quitar las marcas las letras I y B. Solo aparecerá el canal verde (**figura 6 y 7**).

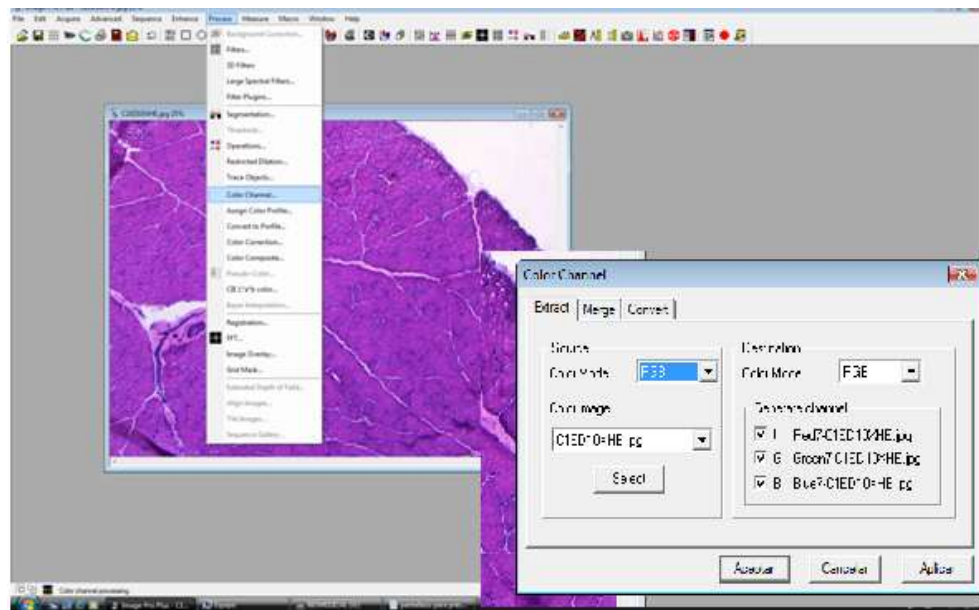


Figura 6. Ruta de acceso para la separación de la imagen en los canales de color (RGB).

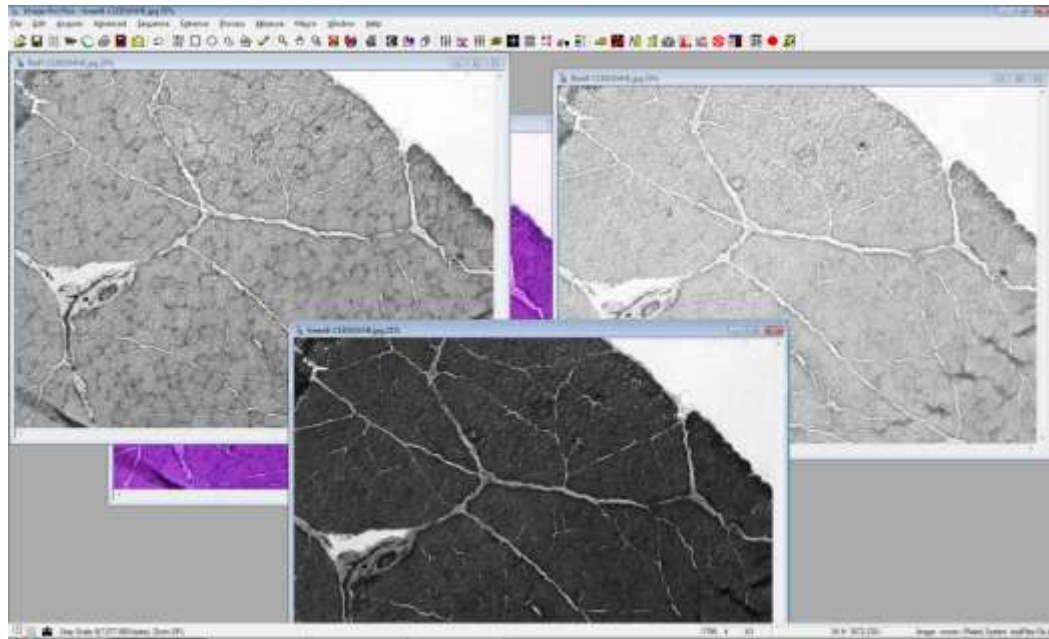


Figura 7. Color channel. Canales de color RGB (red, green, blue).

En la imagen seleccionada, click en la barra de menú: Measure: Manual tag: en el cuadro de diálogo se debe crear el parámetro a medir: click en clases: darle el nombre a la clase y luego seleccionar un color y un símbolo; se recomienda aplicar una sola clase por imagen; a pesar que el sistema permite crear múltiples clases en el mismo instante. Ninguna clase es almacenada después de cerrar el programa (**figuras 8, 9 y 10**).

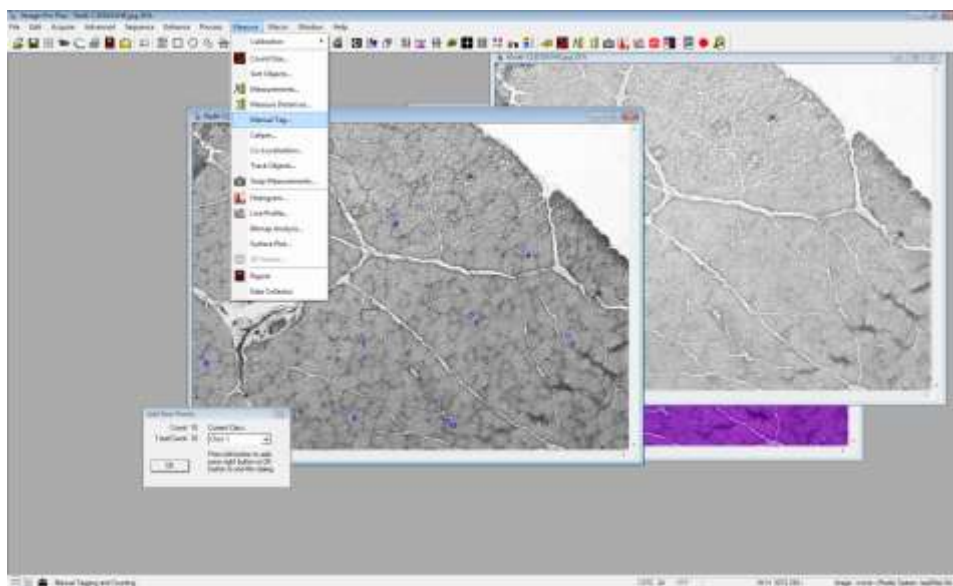


Figura 8. Ruta de acceso a la opción de conteo manual.

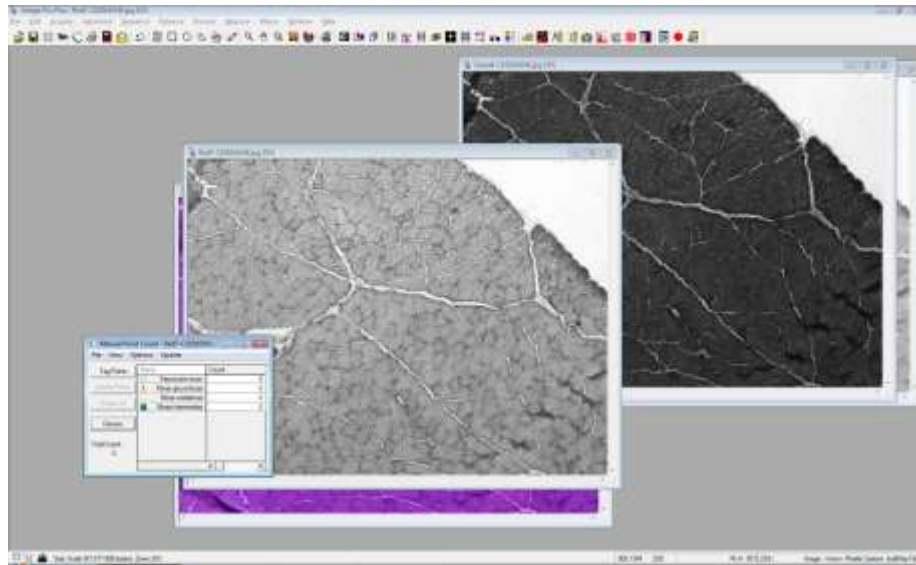


Figura 9. Se establecen las clases para el conteo. Para este caso, tipos de fibras y fascículos musculares.

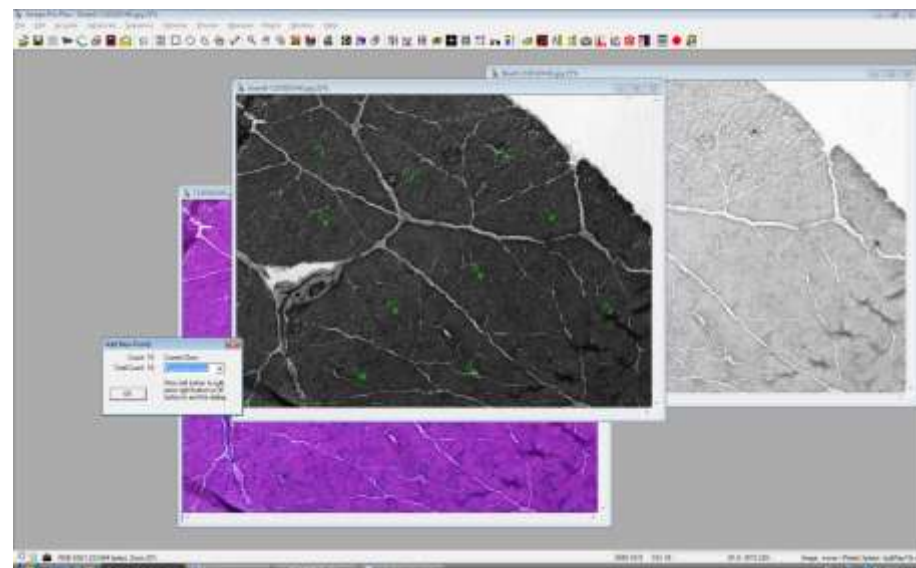


Figura 10. Conteo de fascículos musculares

Los fascículos a identificar serán los secundarios. Los criterios a tener en cuenta para el conteo serán:

1. Están compuestos por fascículos más pequeños denominados primarios
2. Grosor del perimio visible

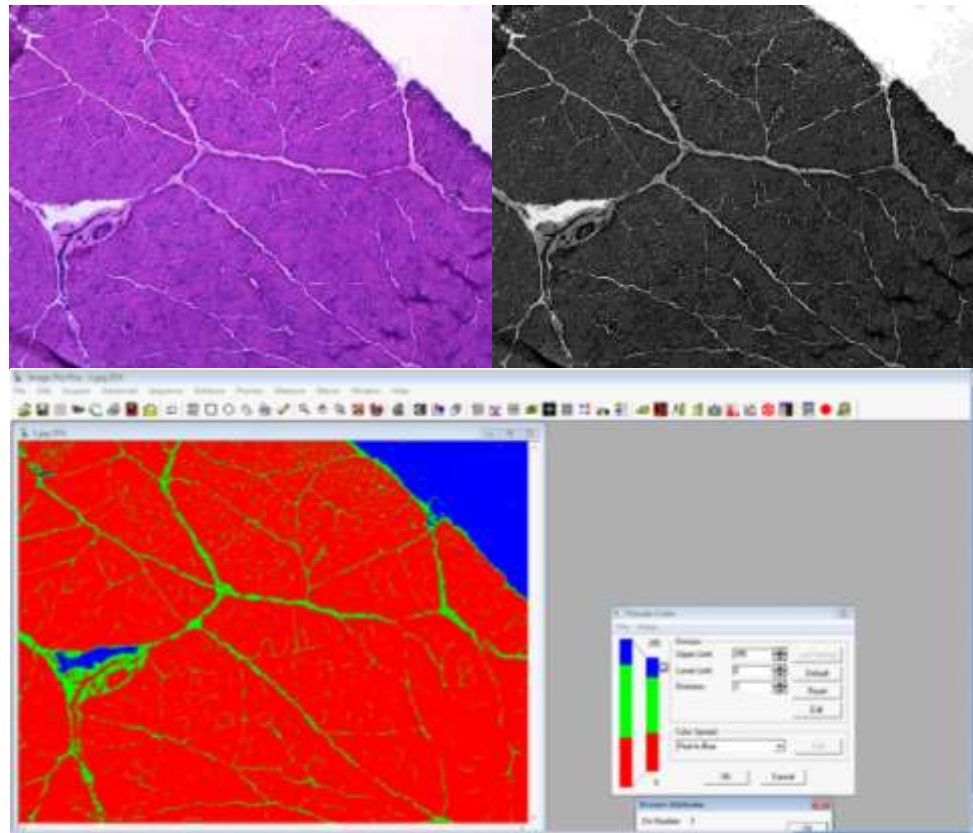


Figura 12. Regiones que resalta cada color en la imagen.

En el recuadro, dar click en áreas para generar el cuadro de dialogo que muestra el área que ocupa cada color. Diligenciar en el formato los correspondientes solo a fibras musculares (para este caso color rojo) y matriz extracelular intramuscular (para este caso color verde). En color azul se muestra una región que no es de interés. *Los colores siempre varían con cada imagen, es decir, no siempre el color rojo indicará fibras musculares.*

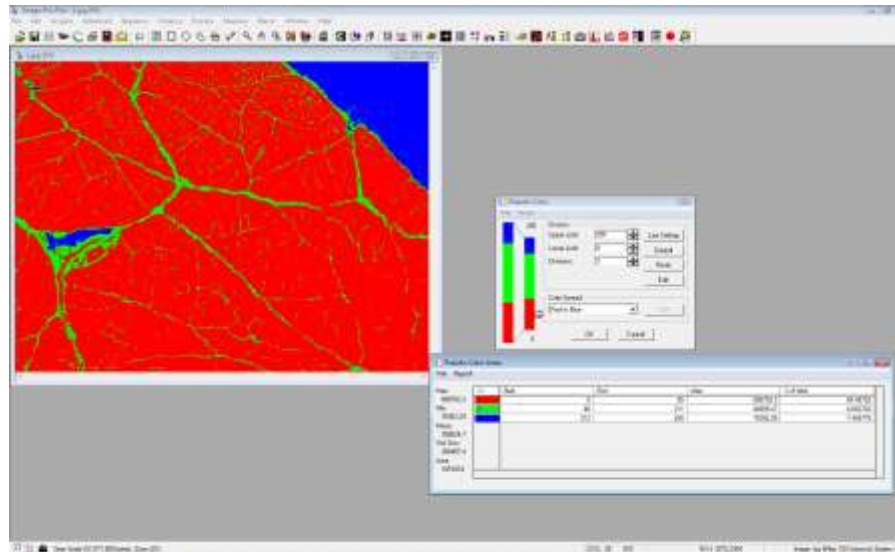


Figura 13. Áreas y porcentaje del total que ocupa cada color.

Se pueden ajustar las regiones a colorear ubicándose en el color y haciendo click en editar.

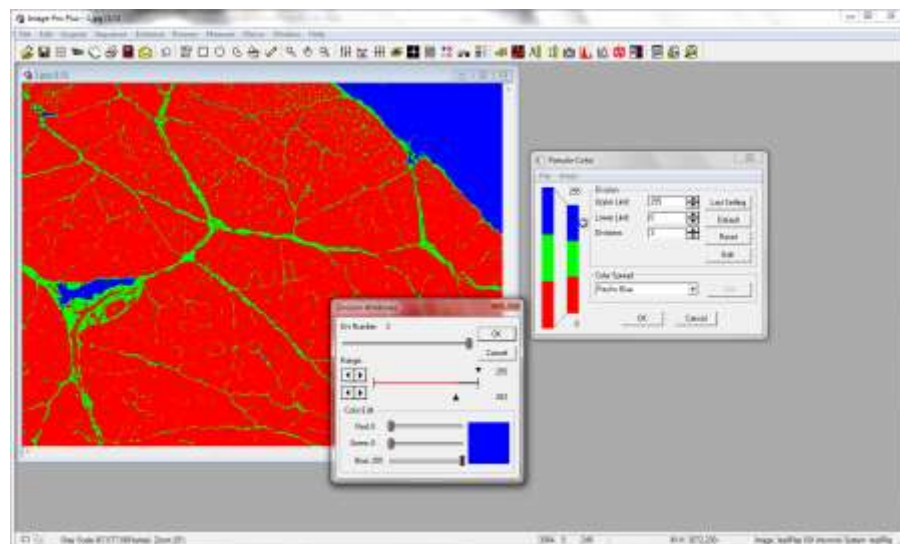


Figura 14. Ajuste de las áreas a medir (solo si se requiere).

Es posible que se requiera utilizar hasta 8 intensidades diferentes para establecer cada área. Las áreas de los colores que indican un mismo tipo de fibra, se deben sumar antes de diligenciar el formato. Registrar los valores obtenidos en el cuadro de Excel.

14.4. Características de los equipos utilizados

Equipo	Marca	Modelo	Mantenimiento	Calibración	Precisión	Volt	Distribuido por:	Observaciones
Balanza electrónica	RADWAG	WLC 2 /A2	no tiene	Automática Max. 2KG (rango de indicación)	d=0.01 g	120	Skala Ltda	Regulador convencional Adquirido en 21/01/10
Congelador -70°C	Sanyo	MDF392	09/06/10	no aplica	no aplica	100	no aplica	Donado por Fundación SASAKAWA Seguimiento diario de temperatura
Micrótopo criostato	Leica	Jung Frigocut 2800N	26/09/11	no aplica	no aplica	110	no aplica	Adquirido en octubre de 1994
Congelador -30°C	Sanyo	MDF435	09/06/11	no aplica	no aplica	100	no aplica	Donado por Fundación SASAKAWA Seguimiento diario de temperatura
Nevera 4°C	SANYO	LAB COOL	no tiene	no aplica	no aplica	120	no aplica	conectada a regulador
Balanza analítica electrónica	RADWAG	WAS 100/X	no tiene	Automática min. 10 mg - max. 100 g (rango de indicación)	d=0.1 mg	120	Skala Ltda	Adquirido en enero 21 de 2010
Estufa de laboratorio	THERMO SCIENTIFIC	Precision C	no tiene	no aplica	no aplica	115	no aplica	
Estufa de laboratorio	THELCO	Precision Scientific	no tiene	no aplica	no aplica	120	no aplica	Adquirido en 01/12/79
Medidor de pH	HANNA Instruments	pH/ORP meter	no tiene	Con buffers estándar a pH 4.0, 7.0 y 10.5	±0.01; ±0.002 pH	120	Analytica S.A.	Adquirido en noviembre 26 de 2009
Plancha de calentamiento con agitador magnetico	FISHER SCIENTIFIC	ISOTEMP C	no tiene	no aplica	no aplica	120	Products Ltda.	
Plancha de calentamiento con agitador magnetico	FISHER	M-145111	no tiene	no aplica	no aplica	115	no aplica	adquirido el 1 de diciembre de 1970
Cabina extractora de gases	C4	FEX 120	23/04/13	no aplica	no aplica	220	Distrumedic a S.A.	29/10/10
Microscopio	Olympus	CH-2	20/11/12	no aplica	no aplica	120	no aplica	1/12/95
Lupa de mesa con lámpara	Dazor	M209	no tiene	no aplica	no aplica	118	no aplica	1/12/70

Nota: Los equipos no cuentan con certificación de calibración en sus hojas de vida.

14.5. Aval del comité de ética animal

Comité de Ética en Medicina y
Experimentación Biomédica
Facultad de Salud

Santiago de Chile, 06 de Diciembre de 2013

Profesores:
LILIANA SALAZAR
A/R
GUSTAVO H. ROSSO
Estudiante de Maestría en Ciencias Biomédicas
Facultad de Salud
La Universidad

El Comité de Ética envía la comunicación con fecha de emisión el 29 de Noviembre de 2013, referente al proyecto "CARACTERIZACIÓN HISTOQUÍMICA Y MORFOMÉTRICA DE MÚSCULOS SOMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN" (05-011) y de acuerdo al contenido del contenido del texto del protocolo quedando en "EVALUACIÓN DE MÚSCULOS ESQUELETICOS SOMETIDOS A PERIODOS DE ISQUEMIA INDUCIDA Y REPERFUSION: ANALISIS HISTOLOGICO Y MORFOMETRICO".

Atentamente,

FERNANDO CASTRO
Presidente
Comité de Ética en Medicina y
Experimentación Biomédica

Vicedecano de Investigación
Facultad de Salud - Comité Ética Animal

APROBACIÓN Y CERTIFICACIÓN INSTITUCIONAL DEL PROYECTO

TÍTULO "CARACTERIZACIÓN HISTOQUÍMICA Y MORFOMÉTRICA DE LOS MÚSCULOS SOLEO Y EXTENSOR RADIAL LONGO DEL CARPO DE RATA WISTAR ADULTA SOMETIDOS A PROCESOS INDUCIDOS DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN" (05-011).

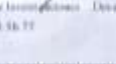
Presentado por los profesores: Liliana Salazar, Departamento de Morfología y la estudiante de Maestría en Ciencias Biomédicas: Gustavo H. Rosso Salazar y el Dr. Fernando Castro.

1. Certifico que el proyecto arriba mencionado fue revisado y aprobado por el Comité de Evaluación Ética en Actividades de Experimentación de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle de acuerdo con los requerimientos de la Ley 19.650 y (Resolución No. 8430 de 1993) del Ministerio de Salud sobre Protección de Animales y con sus garantías de cumplimiento, se aprobó en los Aspectos Éticos.

ACTA No. 1811 de 2011

PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA
(FUNCIONARIO AUTORIZADO DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE)

FIRMA  **FECHA: 25 de 06 de 2011**

IDENTIFICACIÓN 

Dirección: Vicedecano de Investigación - Decanato de Facultad de Salud
Teléfono: 318 36 80 - 318 36 77

ESPACIO PARA LA ENTIDAD AUSPICIADORA

II. Todos los partes de esta garantía están de acuerdo con los requerimientos para la Protección de Animales:

14.6. Registro del torniquete neumático para uso en modelo de isquemia inducida y reperfusión

Dispositivo para inducción de riego.
1: Imán con cubierta en tela lona y
centro de mucho diámetro. 2: tanques
de conexión al manómetro y a la bomba
de inflación manual. 3: Manómetro. 4:
Bomba de inflación. 5: Extensión de
adaptación para la bomba. 6: Válvula de
retención de aire.

[illegible]

15. Referencias bibliográficas

- Alameddine, H. S. (2012). Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: friends or foes? *Neurobiol Dis*, 48(3), 508-518. doi: 10.1016/j.nbd.2012.07.023
- Alfaro, L., Rocca, M., & Poblet, E. (2003). Camaras digitales y transferencia de imagenes al ordenador. *Rev. Esp. Patol.*, 36(2), 119-130. Retrieved from:
- Armand, A. S., Laziz, I., Djeghloul, D., Lécolle, S., Bertrand, A. T., Biondi, O., . . . Chanoine, C. (2011). Apoptosis-inducing factor regulates skeletal muscle progenitor cell number and muscle phenotype. *PLoS One*, 6(11), e27283. doi: 10.1371/journal.pone.0027283
- Baker, J. S., McCormick, M. C., & Robergs, R. A. (2010). Interaction among Skeletal Muscle Metabolic Energy Systems during Intense Exercise. *J Nutr Metab*, 2010, 905612. doi: 10.1155/2010/905612
- Blaisdell, F. W. (2002). The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg*, 10(6), 620-630.
- Brunelli, S., & Rovere-Querini, P. (2008). The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacol Res*, 58(2), 117-121. doi: 10.1016/j.phrs.2008.06.008
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., . . . Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*, 202(1), 59-68.
- Buckingham, M., & Montarras, D. (2008). Skeletal muscle stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 18(4), 330-336. doi: 10.1016/j.gde.2008.06.005
- Caiozzo, V. J., Baker, M. J., Huang, K., Chou, H., Wu, Y. Z., & Baldwin, K. M. (2003). Single-fiber myosin heavy chain polymorphism: how many patterns and what proportions? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285(3), R570-580. doi: 10.1152/ajpregu.00646.2002
- Calderón, J. C., Bolaños, P., & Caputo, C. (2010). Myosin heavy chain isoform composition and Ca(2+) transients in fibres from enzymatically dissociated murine soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Physiol*, 588(Pt 1), 267-279. doi: 10.1113/jphysiol.2009.180893
- Camillo, A. C., Rocha, R. e. C., & Chopard, R. P. (2004). Structural and microvascular study of soleous muscle of Wistar rats after section of the sciatic nerve. *Arq Neuropsiquiatr*, 62(3B), 835-838. doi: /S0004-282X2004000500018
- Carden, D. L., & Granger, D. N. (2000). Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 190(3), 255-266. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6
- Carmo-Araújo, E. M., Dal-Pai-Silva, M., Dal-Pai, V., Cecchini, R., & Anjos Ferreira, A. L. (2007). Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies. *Int J Exp Pathol*, 88(3), 147-154. doi: 10.1111/j.1365-2613.2007.00526.x
- Carvalho, A. J., Hollett, P., & McKee, N. H. (1995). Recovery of synergistic skeletal muscle function following ischemia. *J Surg Res*, 59(5), 527-533. doi: 10.1006/jsre.1995.1202
- Carvalho, A. J., McKee, N. H., & Green, H. J. (1996). Metabolic and contractile responses of fast- and slow-twitch rat skeletal muscles to ischemia. *Can J Physiol Pharmacol*, 74(12), 1333-1341.
- Carvalho, A. J., McKee, N. H., & Green, H. J. (1997). Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. *Plast Reconstr Surg*, 99(1), 163-171.
- Chan, R. K., Austen, W. G., Ibrahim, S., Ding, G. Y., Verna, N., Hechtman, H. B., & Moore, F. D. (2004). Reperfusion injury to skeletal muscle affects primarily type II muscle fibers. *J Surg Res*, 122(1), 54-60. doi: 10.1016/j.jss.2004.05.003
- Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Grimm, S., Georgila, K., Catalgol, B., Friguet, B., . . . Gonos, E. S. (2014). Protein damage, repair and proteolysis. *Mol Aspects Med*, 35, 1-71. doi: 10.1016/j.mam.2012.09.001
- Corona, B. T., & Rathbone, C. R. (2014). Accelerated functional recovery after skeletal muscle ischemia-reperfusion injury using freshly isolated bone marrow cells. *J Surg Res*, 188(1), 100-109. doi: 10.1016/j.jss.2013.12.026

- Cossu, G., & Biressi, S. (2005). Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, 16(4-5), 623-631. doi: 10.1016/j.semcdb.2005.07.003
- Cutlip, R. G., Baker, B. A., Hollander, M., & Ensey, J. (2009). Injury and adaptive mechanisms in skeletal muscle. *J Electromyogr Kinesiol*, 19(3), 358-372. doi: 10.1016/j.jelekin.2008.06.007
- Da Silveira, M., & Bonneti, W. (2004). Ischemia and reperfusion in skeletal muscle: injury mechanisms and treatment perspectives. *J Vasc Br*, 3(4), 367-378.
- de Freitas, C. E. A., Freitas, S. d. B. Z., Lopes, F. d. S., Pai-Silva, M. D., & Piçarro, I. d. C. (2009). Skeletal muscles with antagonistic muscular actions: morphological, contractile and metabolic characteristics / Músculo esquelético con acción muscular antagonista: características metabólicas, contráctiles y morfológicas. *Int. j. morphol*, 27(4), 1173-1178.
- Deldicque, L., Hespel, P., & Francaux, M. (2012). Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle: origin and metabolic consequences. *Exerc Sport Sci Rev*, 40(1), 43-49. doi: 10.1097/JES.0b013e3182355e8c
- Doolan, D. L. (2002). Malaria Methods and Protocols. In A. Howell (Ed.), *Malaria Methods and Protocols* (pp. 351). New Jersey: Humana Press Inc.
- Dragu, A., Schnürer, S., Surmann-Schmitt, C., von der Mark, K., Stürzl, M., Unglaub, F., . . . Horch, R. E. (2011). Gene expression analysis of ischaemia and reperfusion in human microsurgical free muscle tissue transfer. *J Cell Mol Med*, 15(4), 983-993. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01061.x
- Dubowitz, V., Brooke, M., & Neville, H. (1973). *Muscle biopsy: a modern approach* (W. B. S. C. Ltd Ed. Vol. 2th). Philadelphia.
- Estebe, J. P., Davies, J. M., & Richebe, P. (2011). The pneumatic tourniquet: mechanical, ischaemia-reperfusion and systemic effects. *Eur J Anaesthesiol*, 28(6), 404-411. doi: 10.1097/EJA.0b013e328346d5a9
- Fang, S. H., Nishimura, T., & Takahashi, K. (1999). Relationship between development of intramuscular connective tissue and toughness of pork during growth of pigs. *J Anim Sci*, 77(1), 120-130.
- Fano, G., Di Tano, G., Parabita, M., Beltramin, A., & Mariggiò, M. A. (2004). Stem cells in adult skeletal muscle tissue: more than a working hypothesis. *Basic Appl Myol*, 14(1), 13-15.
- Flores, P., Infante-Vasquez, O., G., S., & al., e. (2002). Detección de signos vitales en ratas mediante métodos no invasivos. *Vet. Mex.*, 33(2), 179-187.
- Fong, A. P., & Tapscott, S. J. (2013). Skeletal muscle programming and re-programming. *Curr Opin Genet Dev*, 23(5), 568-573. doi: 10.1016/j.gde.2013.05.002
- Gao, Y., Kostrominova, T. Y., Faulkner, J. A., & Wineman, A. S. (2008). Age-related changes in the mechanical properties of the epimysium in skeletal muscles of rats. *J Biomech*, 41(2), 465-469. doi: 10.1016/j.jbiomech.2007.09.021
- García del Moral, R. (1996). *Laboratorio de Anatomía Patológica*: Mc Graw Hill.
- Ghaly, A., & Marsh, D. R. (2010). Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. *Int J Exp Pathol*, 91(3), 244-255. doi: 10.1111/j.1365-2613.2010.00708.x
- Greene, E. C. (1955). *Anatomy of the rat*. (Vol. 2).
- Gueguen, N., Lefaucheur, L., Fillaut, M., & Herpin, P. (2005). Muscle fiber contractile type influences the regulation of mitochondrial function. *Mol Cell Biochem*, 276(1-2), 15-20. doi: 10.1007/s11010-005-2464-y
- Gómez-Gómez, M., Danglot-Banck, C., & Vega-Franco, L. (2003). Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuando usarlas. *Revista Mexicana de Pediatría*, 70(2), 91-99.
- Hammers, D. W., Sarathy, A., Pham, C. B., Drinnan, C. T., Farrar, R. P., & Suggs, L. J. (2012). Controlled release of IGF-I from a biodegradable matrix improves functional recovery of skeletal muscle from ischemia/reperfusion. *Biotechnol Bioeng*, 109(4), 1051-1059. doi: 10.1002/bit.24382
- Hebling, A., Scabora, J. E., & Esquisatto, M. A. M. (2009). Muscle fiber types and connective tissue morphometry in frontal muscle of norfolk rabbits. 27(1), 187-191. Retrieved from:

- Hocker, A. D., Boileau, R. M., Lantz, B. A., Jewett, B. A., Gilbert, J. S., & Dreyer, H. C. (2013). Endoplasmic Reticulum Stress Activation during Total Knee Arthroplasty. *Physiol Rep*, 1(3), e00052. doi: 10.1002/phy2.52
- Holterman, C. E., & Rudnicki, M. A. (2005). Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol*, 16(4-5), 575-584. doi: 10.1016/j.semcdb.2005.07.004
- Itoh, M., & Kudoh, Y. (2011). Morphologic changes in rat skeletal muscle after anterior tibial muscle and artery ligation. 8, 56-63. Retrieved from:
- Jacobs, R. A., Meinild, A. K., Nordsborg, N. B., & Lundby, C. (2013). Lactate oxidation in human skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304(7), E686-694. doi: 10.1152/ajpendo.00476.2012
- Kaisto, T. (2003). *Special features of vesicle trafficking in skeletal muscle cells*. (Postgraduate), University of Oulu, Finland.
- Kalmar, B., Blanco, G., & Greensmith, L. Determination of Muscle Fiber Type in Rodents.
- Kjaer, M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev*, 84(2), 649-698. doi: 10.1152/physrev.00031.2003
- Korth, U., Merkel, G., Fernandez, F. F., Jandewerth, O., Dogan, G., Koch, T., . . . Klein, J. (2000). Tourniquet-induced changes of energy metabolism in human skeletal muscle monitored by microdialysis. *Anesthesiology*, 93(6), 1407-1412.
- Küçükler, I., Tuncer, S., Sencan, A., Bircan, F., Çağlar, E., Elmas, C., & Ayhan, S. (2012). The effect of surgical and chemical denervation on ischaemia/reperfusion injury of skeletal muscle. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 65(2), 240-248. doi: 10.1016/j.bjps.2011.09.005
- Latorre, R., Gil, F., & Vasquez, J. (1993). Skeletal muscle fiber types in the dog. *J. Anat.*, 182, 329-337. Retrieved from:
- Lo, K. W., Jiang, T., Gagnon, K. A., Nelson, C., & Laurencin, C. T. (2014). Small-molecule based musculoskeletal regenerative engineering. *Trends Biotechnol*, 32(2), 74-81. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.12.002
- Loerakker, S., Manders, E., Strijkers, G. J., Nicolay, K., Baaijens, F. P., Bader, D. L., & Oomens, C. W. (2011). The effects of deformation, ischemia, and reperfusion on the development of muscle damage during prolonged loading. *J Appl Physiol* (1985), 111(4), 1168-1177. doi: 10.1152/japplphysiol.00389.2011
- Ma, A., Qi, S., & Chen, H. (2008). Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 6(1), 20-43.
- Maldjian, J. A., Laurienti, P. J., Kraft, R. A., & Burdette, J. H. (2003). An automated method for neuroanatomic and cytoarchitectonic atlas-based interrogation of fMRI data sets. *Neuroimage*, 19(3), 1233-1239.
- Mars, M., & Gregory, M. A. (1991). A histometric analysis of skeletal myofibers following 90 min of tourniquet ischemia and reperfusion. *J Surg Res*, 50(2), 191-195.
- Martinsson, T., Oldfors, A., Darin, N., Berg, K., Tajsharghi, H., Kyllerman, M., & Wahlstrom, J. (2000). Autosomal dominant myopathy: missense mutation (Glu-706 --> Lys) in the myosin heavy chain IIa gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14614-14619. doi: 10.1073/pnas.250289597
- McEwen, J. A. (2013). www.tourniquets.org. Retrieved Marzo de 2013, 2013, from www.tourniquets.org
- Mendoza, H., Bautista, G. (2002). Diseño Experimental. Retrieved Junio 17 de 2014, 2014
- Mense, S. (2009). Algesic agents exciting muscle nociceptors. *Exp Brain Res*, 196(1), 89-100. doi: 10.1007/s00221-008-1674-4
- Morgan, J. E., & Partridge, T. A. (2003). Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(8), 1151-1156.
- Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A., & Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development*, 138(17), 3625-3637. doi: 10.1242/dev.064162
- Pullen, A. H. (1977). The distribution and relative sized of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. *J Anat*, 123(Pt 2), 467-486.

- Purslow, P. P. (2010). Muscle fascia and force transmission. *J Bodyw Mov Ther*, 14(4), 411-417. doi: 10.1016/j.jbmt.2010.01.005
- Reyes-Juárez, J. L., & Zarain-Herzberg, Á. (2006). Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. *Arch. Cardiol. Méx.*, 76(4).
- Rivas, D. A., Lessard, S. J., Saito, M., Friedhuber, A. M., Koch, L. G., Britton, S. L., . . . Hawley, J. A. (2011). Low intrinsic running capacity is associated with reduced skeletal muscle substrate oxidation and lower mitochondrial content in white skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300(4), R835-843. doi: 10.1152/ajpregu.00659.2010
- Rácz, I. B., Illyés, G., Sarkadi, L., & Hamar, J. (1997). The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. *Eur Surg Res*, 29(4), 254-263.
- Saclier, M., Cuvellier, S., Magnan, M., Mounier, R., & Chazaud, B. (2013). Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS J*. doi: 10.1111/febs.12166
- Saltzman, D. J., Kerger, H., Jimenez, J. C., Farzan, D., Wilson, J. M., Thompson, J. E., & Intaglietta, M. (2013). Microvascular changes following four-hour single arteriole occlusion. *Microsurgery*, 33(3), 207-215. doi: 10.1002/micr.22051
- MPGIRHS. Manual de procedimientos para la gestión integral de residuos hospitalarios y similares en Colombia (2004).
- Sanchez-Collado, C. (2009). *Estudio histoquímico e inmunohistoquímico de los músculos de la lengua, paladar y faringe en el perro (canis familiaris L.)*. (Tesis doctoral), Universidad de Murcia.
- Sanes, J. R. (2003). The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem*, 278(15), 12601-12604. doi: 10.1074/jbc.R200027200
- Sassoli, C., Nosi, D., Tani, A., Chellini, F., Mazzanti, B., Quercioli, F., . . . Formigli, L. (2014). Defining the role of mesenchymal stromal cells on the regulation of matrix metalloproteinases in skeletal muscle cells. *Experimental Cell Research*, 323(2), 297-313. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.03.003>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91(4), 1447-1531. doi: 10.1152/physrev.00031.2010
- Scianna, M., Bell, C. G., & Preziosi, L. (2013). A review of mathematical models for the formation of vascular networks. *J Theor Biol*, 333, 174-209. doi: 10.1016/j.jtbi.2013.04.037
- Sivitz, W. I., & Yorek, M. A. (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 12(4), 537-577. doi: 10.1089/ars.2009.2531
- Soukup, T., Vydra, J., & Cerný, M. (1979). Changes in ATPase and SDH reactions of the rat extrafusal and intrafusal muscle fibres after preincubations at different pH. *Histochemistry*, 60(1), 71-84.
- Soukup, T., Zacharová, G., & Smerdu, V. (2002). Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem*, 104(4), 399-405. doi: 10.1078/0065-1281-00660
- Souza Filho, M. V., Loiola, R. T., Rocha, E. L., Simão, A. F., Gomes, A. S., Souza, M. H., & Ribeiro, R. A. (2009). Hind limb ischemic preconditioning induces an anti-inflammatory response by remote organs in rats. *Braz J Med Biol Res*, 42(10), 921-929.
- Torrejais, M. M., Soares, J. C., Matheus, S. M. M., Francia-Farje, L. A. D., Mello, J. M., & Vicente, E. J. D. (2012). Morphologic Alterations Resulting from Denervation of the Diaphragm in Rats. *Alteraciones morfológicas resultantes de la denervación del diafragma en ratas.*, 30(3), 1150-1157.
- Turrina, A., Martínez-González, M. A., & Stecco, C. (2013). The muscular force transmission system: role of the intramuscular connective tissue. *J Bodyw Mov Ther*, 17(1), 95-102. doi: 10.1016/j.jbmt.2012.06.001
- Vignaud, A., Hourde, C., Medja, F., Agbulut, O., Butler-Browne, G., & Ferry, A. (2010). Impaired skeletal muscle repair after ischemia-reperfusion injury in mice. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 724914. doi: 10.1155/2010/724914

- Vignoli, R. (2006). Esterilización, desinfección y antisepsia. In U. d. l. R. F. d. M. D. d. B. y. Virología. (Ed.), *Temas de bacteriología y virología médica*. (pp. 609-629).
- von Degenfeld, G., Banfi, A., Springer, M. L., & Blau, H. M. (2003). Myoblast-mediated gene transfer for therapeutic angiogenesis and arteriogenesis. *Br J Pharmacol*, 140(4), 620-626. doi: 10.1038/sj.bjp.0705492
- Walters, T. J., Kragh, J. F., & Baer, D. G. (2008). Influence of fiber-type composition on recovery from tourniquet-induced skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33(2), 272-281. doi: 10.1139/H07-180
- Wiendl, H., Hohlfeld, R., & Kieseier, B. C. (2005). Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol*, 26(7), 373-380. doi: 10.1016/j.it.2005.05.003
- Woitaskie, M. D., & McCarter, R. J. (1998). Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg*, 102(6), 2052-2063.
- Young, I., Gerbrands, J., & van Vliet, L. (1998). *Fundamentals of image processing* (2 ed.): Delf University of Technology.
- Zhang, Y., Han, Z. H., Zhong, Y. F., Wang, S. L., Li, L. L., & Zheng, D. F. (2009). [Improvement and application of diagnostic techniques of the skeletal muscle biopsy]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 41(4), 459-462.