

Metodología de laboratorio para el estudio histológico del músculo esquelético

Fernando Leiva-Cepas^{1,2,3}, Ignacio Ruz-Caracuel^{1,2*}, María A. Peña-Toledo^{2,3}, Antonio Agüera-Vega^{1,2}, Ignacio Jimena^{1,2,3}, Evelio Luque^{1,3}, José Peña^{1,2,3}

¹Departamento de Ciencias Morfológicas. Universidad de Córdoba. Córdoba. ²Grupo de Investigación en Regeneración Muscular. Universidad de Córdoba. ³Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba. IMIBIC. Córdoba. *Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario La Paz, IDIPAZ, Madrid.

Recibido: 11.12.2017
Aceptado: 15.02.2018

Resumen

El músculo esquelético es un tejido maleable y dinámico capaz de un alto grado de plasticidad con respecto a su configuración histológica. En este sentido, el estudio microscópico es una herramienta importante y esencial para el análisis de los procesos adaptativos –como la hipertrofia o los cambios de tipos de fibras– y la regeneración o reparación del músculo esquelético después de la lesión, en las áreas de la medicina deportiva y la traumatología respectivamente. Mientras que con microscopía óptica se aborda el estudio de los diferentes elementos constitutivos del músculo esquelético y sus relaciones entre sí que determinan la histoarquitectura del órgano, con microscopía electrónica se realiza el análisis ultraestructural que permite relacionar estructura y función de las células individuales. Este artículo ilustra un enfoque pragmático y práctico, en base a la experiencia personal y una revisión de la literatura, desde las condiciones en la obtención y envío de las muestras de músculo esquelético al laboratorio a los procedimientos para prepararlas para su estudio histológico (secciones de criostato, secciones de parafina y microscopía electrónica). Especialmente nos centramos en la descripción del procesado por congelación y recomendaciones a seguir, al ser éste el método ideal para este tejido. El objetivo de este artículo es proporcionar información útil sobre el manejo de muestras de músculo esquelético que se procesan en el laboratorio de histología para lograr resultados óptimos y fiables en los análisis microscópicos y cómo evitar los errores metodológicos que conducen a la aparición de artefactos que pueden llegar a dificultar o invalidar el estudio histológico.

Palabras clave:

Músculo esquelético.
Histología muscular. Ultraestructura muscular. Biopsia muscular. Cortes congelados. Microscopía electrónica.

Laboratory methodology for the histological study of skeletal muscle

Summary

Skeletal muscle is a malleable and dynamic tissue capable of a high degree of plasticity in regards to its histological configuration. In this sense, microscopic study is an important and essential tool for the analysis of adaptive processes -such as hypertrophy or changes of fiber types- and the regeneration or repair of skeletal muscle after injury, in the fields of sports medicine and traumatology respectively. While light microscopy addresses the study of the different constitutive elements into the skeletal muscle and their relationships with each other that determine the organ histoarchitecture, with electron microscopy an ultrastructural analysis is carried out that allows to relate the structure and function of the individual cells. This article illustrates a pragmatic and practical approach, based on personal experience and a review of the literature, from the conditions in obtaining and sending samples of skeletal muscle to the laboratory to the procedures to prepare them for histological study (sections of cryostat, paraffin sections and electron microscopy). Especially we focus on the description of the processing by freezing and recommendations to follow, as this is the ideal method for this tissue. The aim of this article is to provide useful information on the management of skeletal muscle samples that are processed in the histology laboratory to achieve optimal and reliable results in microscopic analyzes and how to avoid methodological errors that lead to the appearance of artifacts that can get to hinder or invalidate the histological study.

Key words:

Skeletal muscle. Muscle histology. Muscle ultrastructure. Muscle Biopsy. Frozen section. Electron microscopy.

Correspondencia: José Peña Amaro
E-mail: cm1peamj@uco.es

Introducción

La evaluación microscópica del músculo esquelético es parte esencial en el estudio de la histofisiología muscular en la actividad física y deportiva^{1,2}, lesiones musculares en el deporte^{3,4} e investigación básica en miología y miopatología experimental⁵⁻⁷. El conocimiento de la histología del músculo esquelético permite entender los mecanismos tisulares, celulares y moleculares implicados en las respuestas adaptativas al ejercicio –hipertrofia, hiperplasia y remodelación de tipos de fibras– o en la regeneración muscular postlesión^{8,9}. También permite conocer y comprender los efectos específicos que sobre la estructura y función de fibras musculares, células satélites, matriz extracelular, innervación, vascularización o uniones mioconectivas tienen determinados tipos de ejercicios¹⁰⁻¹², sustancias¹³, nutrientes¹⁴, fármacos¹⁵, estrategias rehabilitadoras¹⁶ o terapias en medicina regenerativa¹⁷.

Para abordar el estudio microscópico del músculo esquelético se requiere de instrumentos amplificantes como *microscopios ópticos* y *electrónicos* además de *técnicas* que ponen de manifiesto los diferentes componentes de su estructura (Figura 1). Así, los rasgos estructurales se abordan mediante técnicas *histológicas*, con técnicas *histoquímicas* visualizamos actividades enzimáticas y no enzimáticas que ayudan a tipificar la diversidad y distribución de tipos de fibras o la identificación de determinadas sustancias y con el empleo de anticuerpos y mediante técnicas *inmunoistoquímicas* visualizamos y localizamos componentes proteicos específicos tanto celulares como extracelulares.

Mientras que en secciones de biopsias o muestras musculares con microscopía óptica se lleva a cabo el *estudio histoarquitectural* o *análisis de conjunto* de todos los elementos que integran el músculo como órgano, con microscopía electrónica abordamos el *estudio ultraestructural* o *análisis individualizado* y detallado de cada uno de ellos¹⁸. Otra metodología permite aislar fibras musculares para analizar con microscopía óptica en fibras musculares individualizadas, el comportamiento de elementos como mionúcleos y células satélites¹⁹. Aunque menos utilizada por la limitada información que puede ofrecernos, la microscopía electrónica de barrido es otra opción muy útil en el examen tridimensional de fibras musculares y su relación con las fibras nerviosas a nivel de placa motora o el andamiaje conectivo del músculo esquelético²⁰ (Figura 1).

En nuestra opinión, cualquier interesado en realizar algún tipo de estudio microscópico sobre músculo esquelético debe de conocer el procedimiento o metodología a seguir con las muestras obtenidas, fundamentalmente porque se trata de un tejido/órgano que precisa de un protocolo muy específico para su procesamiento en el laboratorio que debe seguirse estrictamente para que la evaluación histológica resulte óptima²¹. En el presente artículo se recogen el procedimiento, metodología y recomendaciones que permiten garantizar la adecuada preparación específica de las muestras, esencial para la interpretación histológica del músculo esquelético.

De qué músculo, qué cantidad y cómo debe ser tomada la muestra

Tanto si se trata de músculo humano o de animales experimentales el procedimiento de laboratorio a seguir es el mismo, salvo para la toma de muestras. En ambos casos los requerimientos esenciales y condiciones necesarias para la obtención de la muestra y su correcto envío al laboratorio son las mismas y debe seguirse escrupulosamente para evitar que la muestra pueda quedar completamente inservible.

En músculo humano existen dos procedimientos estandarizados: biopsia abierta y biopsia con aguja^{22,23}. Mientras que ambos procedimientos se emplean para el diagnóstico de enfermedades neuromusculares²⁴, el segundo es el empleado para los estudios en deportistas^{10,25,26}. La *biopsia abierta* se lleva a cabo en quirófano sin una preparación especial previa (consultar requerimientos especiales en bibliografía especializada)^{22,27}. Tras la anestesia local se realiza una pequeña incisión cutánea (2-3 cm) sobre el vientre del músculo, se extrae un bloque de tejido muscular de 0,5 cm de diámetro y 1 cm de longitud (equivalente al "hueso de una aceituna pequeña") (Figura 2). La *biopsia con aguja* requiere de un instrumento –la aguja modificada de Bergström–, de la realización de una incisión cutánea (1cm) con anestesia local, insertando la aguja hasta el plano muscular y extrayendo el músculo– (consultar requerimientos especiales en bibliografía especializada)^{22,27,28}. Existe el riesgo de que la cantidad de músculo obtenida sea insuficiente para realizar el diagnóstico y que el procedimiento

Figura 1. Diversidad de estudios microscópicos para el análisis del músculo esquelético.

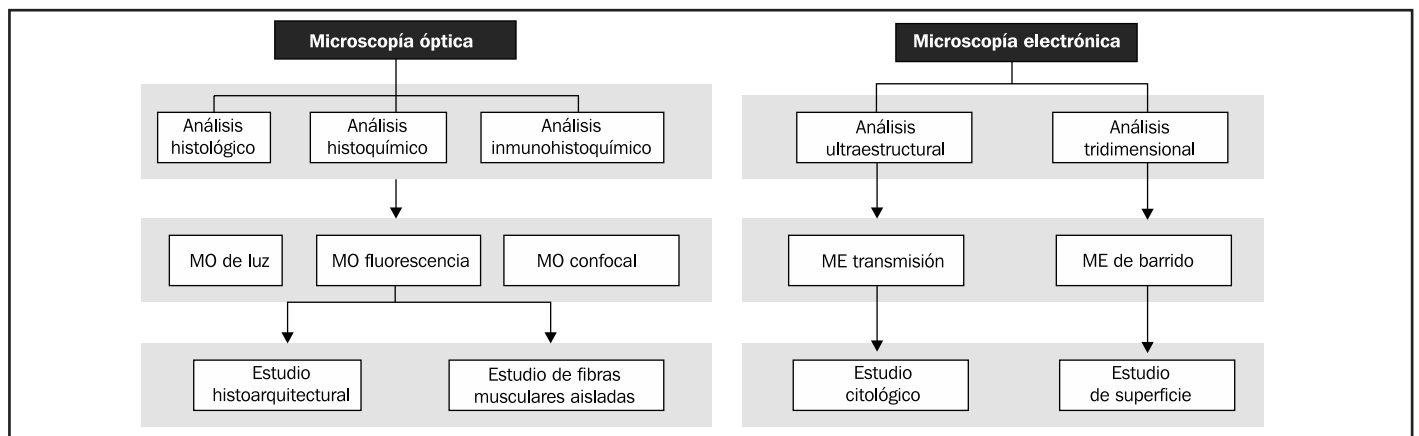
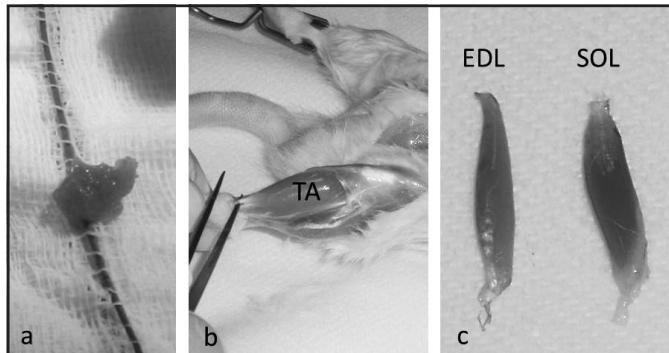


Figura 2. Aspecto macroscópico de (a) un fragmento de músculo humano tomado mediante biopsia abierta y (b) músculos completos tibial anterior *in situ* (TA), extensor digital largo (EDL) y sóleo (SOL).



de extracción provoque artefactos en la muestra además de dificultar mucho la correcta orientación durante el montaje. Ciertos músculos no pueden ser biopsiados con esta técnica. Los especímenes obtenidos deben ser manipulados lo menos posible, evitando los estiramientos y aplastamientos. Si la muestra está ensangrentada la enjuagamos rápidamente en suero salino.

Tanto si se trata de biopsia o de cadáver, la toma de muestra debe realizarse del vientre muscular. Los motivos son: a) es en ésta zona donde las fibras musculares presentan su mayor área transversal, lo que resulta esencial a la hora de valorar los tamaños de las fibras musculares y; b). la zona próxima a la región miotendinosa deben evitarse (alejándose al menos unos 2 cm) (salvo cuando el objetivo perseguido sea el estudio de esa zona) ya que, además de que en su terminación las fibras musculares disminuyen su diámetro, presentan rasgos histológicos que si bien son normales, difieren notablemente de cualquier otras zonas del músculo²⁹. Tampoco se deben biopsiar músculos con traumatismo reciente ni pinchados con anestésicos locales o agujas para electromiografía; en cualquier caso la elección de los músculos para biopsia está en función de criterios médicos o científicos en función del objetivo que se persigue. En estudios con músculos de cadáver los procedimientos y recomendaciones son los mismos aunque la toma de muestras debe realizarse dentro de las 24 horas posteriores a la muerte ya que este intervalo postmortem no obstaculiza el análisis histoquímico de los tejidos autopsiados³⁰; sin embargo no es recomendable el examen en microscopía electrónica de músculo de autopsia por los efectos de la autólisis postmortem³¹. El estudio de muestras musculares de cadáveres ya fijados en formol no es recomendable por su gran propensión a estropearse generando artefactos en las fibras musculares como contracción, agrietamiento e incluso por fijación imperfecta³¹.

En investigaciones con *animales de experimentación*, los músculos objeto de estudio son generalmente extraídos por completo (Figura 2), aunque para su procesamiento se toma también el vientre muscular. La mayoría se realizan sobre los músculos sóleo y extensor digital largo (músculos típicamente rojo y blanco respectivamente)³² y sobre tibial anterior y gastrocnemio, cuando se precisa para la investigación un mayor volumen muscular y de fácil acceso en su manipulación³³.

Cómo enviar la muestra al laboratorio

Independientemente del tipo de estudio que se pretenda realizar, una vez tomada la muestra debe ser inmediatamente remitida al laboratorio puesto que los procesos de autólisis celular comienzan desde el mismo momento de la extracción. Las indicaciones para su transporte son las siguientes:

- Se transportará procurando que se mantenga fresca y húmeda, colocando una gasa empapada y escurrida en suero fisiológico; en ningún caso, se remitirá sumergida (ni previamente sumergida) en agua, suero fisiológico o sustancias fijadoras ya que el exceso de humedad genera posteriormente artefactos en la congelación.
- El tiempo transcurrido desde su obtención hasta el inicio del procedimiento de preparación en el laboratorio debe ser reducido. El retraso por encima de 45 minutos en la llegada al laboratorio puede provocar artefactos por hipercontracción o deshidratación de las fibras musculares²⁹. Aunque nunca debe superar las 4 horas³⁴, un retraso en la congelación de hasta 48h no tiene efecto para la histoquímica enzimática³⁵. En el caso de que la muestra no pueda ser enviada al laboratorio inmediatamente recomendamos mantenerla mientras tanto en el frigorífico a 4°C. Otro método consiste en que el músculo esquelético sea transportado en ACTP (medio de preservación de células/tejidos Aedesta™) ya que está mejor conservado y exhibe menos artefactos que el músculo transportado a través de métodos convencionales³⁶.

Cómo procesar la muestra en el laboratorio

Una vez en el laboratorio la muestra se dividirá en tres fragmentos, dos para su análisis en *microscopía óptica* y otro para *microscopía electrónica* (Figura 3). Puede ser necesario tomar tejido para extracción de proteínas o de ADN en investigación bioquímica y/o genética; el fragmento para estos estudios debe ser conservado a -70°C^{29,37} y seguir posteriormente procedimientos diferentes al que se sigue para el estudio microscópico y deben ser consultados en la bibliografía específica^{19,21}.

Preparación de muestras para microscopía óptica

Las muestras deben ser procesadas de manera que permitan la posibilidad de recoger la máxima información de todos o de la mayoría de los elementos que constituyen el músculo esquelético como órgano (Tabla 1). Para garantizar que consigamos "ver" al microscopio lo que buscamos es necesario conocer la histología muscular, de lo contrario podemos preparar las muestras inadecuadamente inutilizando así el estudio. Por ejemplo, es fundamental conocer la disposición de las fibras musculares para orientar la muestra transversal o longitudinalmente, la zona de línea motora para analizar placas motoras (conjuntamente con estudios electrofisiológicos)²⁹, la composición y distribución de tipos de fibras en un determinado músculo para la correcta evaluación de las variaciones porcentuales de las mismas, o las características específicas de las uniones mioconectivas para su justa valoración en las lesiones producidas a ese nivel.

En el procedimiento de preparación de muestras para microscopía óptica se pueden tomar dos fragmentos, uno para su *fijación en formol*

Figura 3. Resumen esquemático de las tres rutas de procesamiento aplicadas al tejido muscular esquelético.

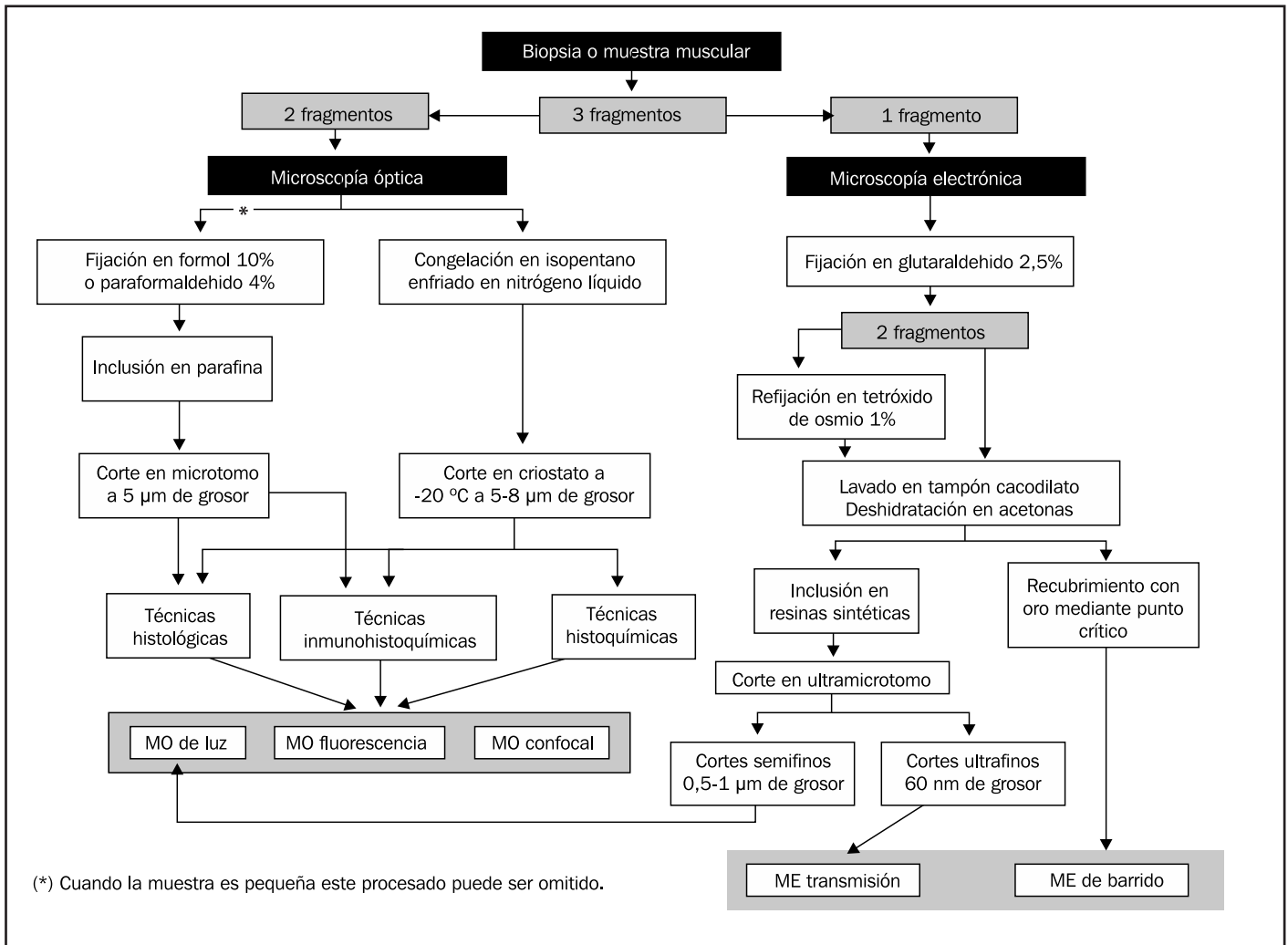


Tabla 1. Objetivos de análisis en el estudio histoarquitectural.

Microscopía óptica: estudio histoarquitectural
Rasgos histológicos generales de las fibras musculares:
- Forma y tamaño.
- Localización de los mionúcleos.
- Tipos de fibras: porcentajes y distribución intramuscular.
Células satélites.
Organización y relaciones de las cubiertas conectivas:
- Endomisio.
- Perimisio.
- Epimisio.
Elementos vasculares y su distribución.
Elementos nerviosos:
- Nervios.
- Uniones neuromusculares.
- Husos neuromusculares.
Uniones mioconectivas:
- Miotendinosa.
- Miofascial.

al 10% e inclusión en parafina y otro para su congelación en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Sin embargo el primer tipo procesado (el habitual seguido para cualquier otro tipo de tejido/órgano) tiene un valor muy limitado en el caso del músculo esquelético. Las razones son: a) la fijación en formol e inclusión en parafina generan en la estructura muscular cambios artefactuales que reducen la correcta interpretación microscópica³⁸ y; b) no permite preservar determinados componentes celulares (enzimas, lípidos, etc.) lo que limita notablemente la tipificación de tipos de fibras e impide el reconocimiento de determinados tipos de cambios que no pueden ser vistos en muestras procesadas con la técnica histológica general³⁹. En cualquier caso, recomendamos, siempre que sea posible, guardar algún fragmento para el procesamiento habitual.

Procesado de muestras por congelación

Es el método preferente para el estudio microscópico del músculo esquelético ya que permite conservar intacta no sólo la histología sino también la estructura antigénica del tejido o su contenido enzimático, además de actuar como método para detener la autólisis y la

putrefacción tisular. La clave de una correcta fijación del tejido por congelación radica en que su realización sea instantánea, ya que un enfriamiento lento provoca la formación de microcristales intracelulares de hielo, susceptibles de agregarse con el paso del tiempo y de producir rotura tisular que dificultan o impiden completamente el análisis microscópico. Este problema es conocido como "artefacto de congelación" y se evita siguiendo algunas recomendaciones: i. el tamaño de la muestra a congelar debe ser pequeño (1,0 x 1,5 cm)⁴⁰ y ii. realizar la congelación empleando un mediador como el isopentano enfriado en nitrógeno líquido porque agiliza la congelación y evita la formación de cristales intracelulares que rompen a las fibras musculares cuando la congelación es lenta o se usa sólo nitrógeno líquido³⁹. El procedimiento completo es como sigue y se debe insistir en que hay que ser extremadamente cuidadoso en la manipulación de la muestra para no provocar artefactos:

1. Tallado y montaje (Figuras 4a-f):

- El fragmento o espécimen muscular debe tener unas medidas aproximadas de 4 mm de diámetro y de 8 a 10 mm de longitud (Figura 4a). Si es muy grueso su interior no se congelará de forma óptima. Para el tallado aconsejamos utilizar una cuchilla de afeitar partida por su mitad; mientras que con una mantenemos sujeta la muestra a la superficie, con la otra procedemos a cortar (Figura 4b).
- Se puede recurrir a la ayuda de una lupa microscópica para orientar correctamente la muestra en el tallado, lo que es necesario cuando las muestras han sido obtenidas mediante biopsia con aguja (Figura 4c).
- El fragmento tallado es montado sobre una pequeña lámina de corcho (en cuya base habremos identificado la muestra) utilizando OCT Compound Tissue®, aplicado sólo en el soporte de corcho (Figura 4d) y siendo extremadamente cuidadosos para evitar que el músculo quede embadurnado o cubierto por OCT® lo que produciría artefactos de congelación muy severos al actuar como un aislante que impide la congelación rápida^{27,38}.
- Durante este montaje la orientación correcta de la muestra es fundamental para obtener secciones transversales (tipo de corte que se debe emplear para evaluar una biopsia muscular) por lo que las fibras musculares deben quedar orientadas perpendiculares con respecto a las superficies de montaje (soporte de corcho) y de corte (cuchilla del criostato). Para ello nos ayudamos de pinzas finas y agujas histológicas manteniendo el cuidado de no dañar el tejido (Figura 4e).
- Si es demasiado largo puede curvarse resultando en la oblicuidad de las fibras musculares perdiendo éstas su orientación transversal⁴¹. En nuestro laboratorio para evitarlo pinchamos una aguja en el corcho para que actúe como soporte evitando la caída de la muestra en los momentos previos a la congelación (Figura 4f). Una vez congelada procedemos a la retirada de la aguja.

2. Congelación (Figuras 4 g-l):

La congelación del músculo esquelético requiere del empleo de isopentano (2 metil-butano) ya que no puede ser directamente sumergido en nitrógeno líquido. Esto es debido al relativo calor del tejido que provoca la vaporización del nitrógeno líquido adyacente a él, actuando como aislante para la congelación y generando importantes artefactos³⁸. La solución es congelar en isopentano enfriado en nitrógeno líquido,

el cual no penetra en el tejido ni impide o altera la realización posterior de las técnicas de tinción.

El procedimiento de congelación es como sigue:

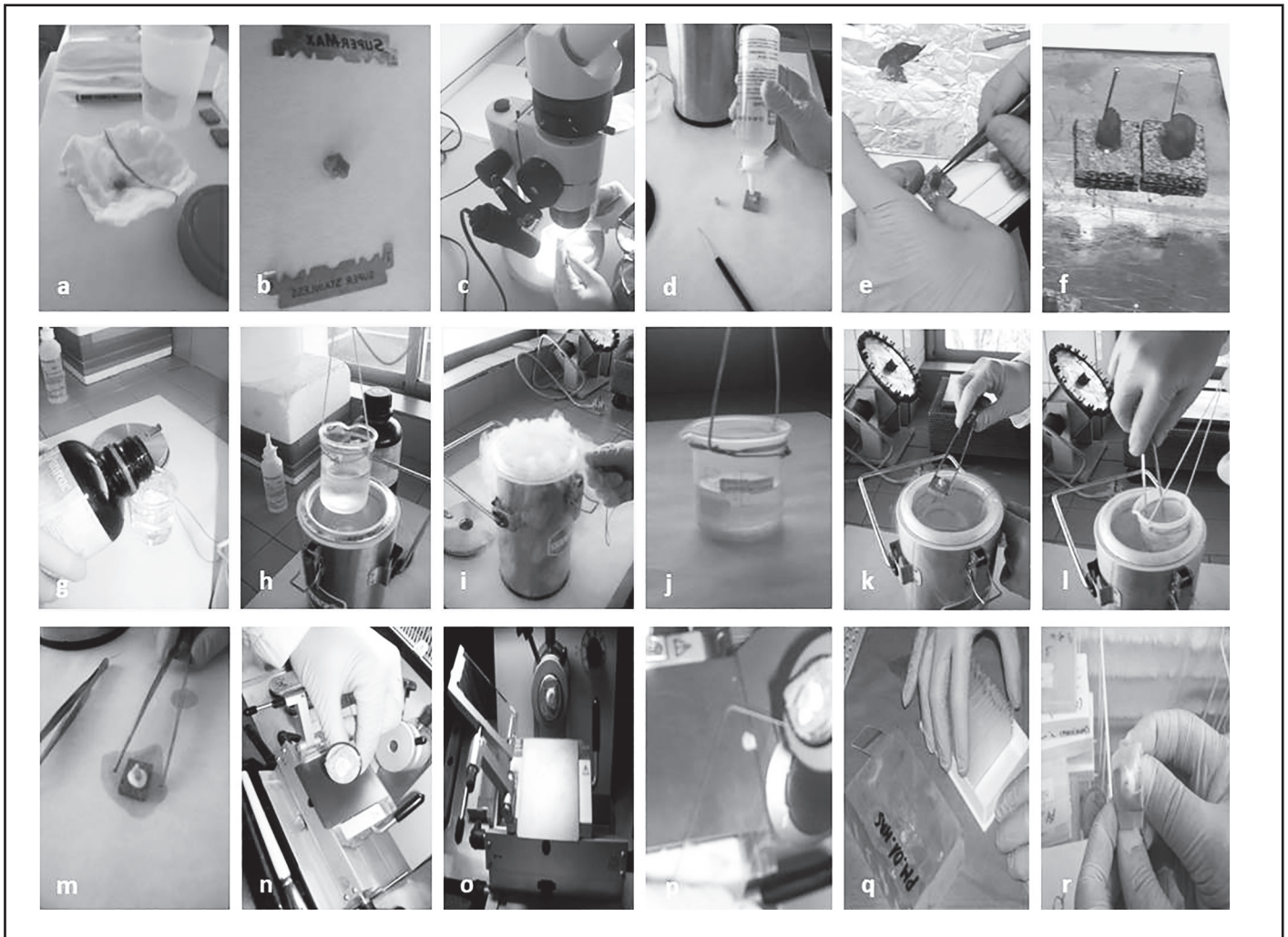
- Veter 80 cc de isopentano en un vaso de precipitado de 100 ml (Figura 4g).
- Suspender el vaso y sumergirlo en nitrógeno líquido (-160°C) (sin que éste sobrepase el vaso) evitando que entre en el isopentano (Figura 4h). La primera vez que se introduzca y mientras exista gran diferencia de temperatura entre ambas sustancias, ocurrirá una gran vaporización del nitrógeno líquido que dificultará la visión del vaso (Figura 4i). Este fenómeno suele disminuir a los 2-4 minutos.
- Al alcanzar la temperatura del nitrógeno líquido el isopentano se congela apareciendo placas blancas que solidifican en las paredes y fondo del vaso de precipitado, indicando que ha alcanzado la temperatura del nitrógeno líquido (Figura 4j). En nuestro laboratorio una vez que ha ocurrido esto retiramos el vaso de precipitado y raspamos con cuidado su base y paredes hasta desaparecer las placas y, a continuación, repetimos el proceso y está entonces listo para proceder a introducir la muestra.
- Resumergir el vaso de precipitado y la solidificación de las paredes y fondo será muy rápida. En este momento introducimos la muestra en su soporte de corcho el vaso de isopentano utilizando para ello unas pinzas largas (Figura 4k).
- Mantener el bloque en el isopentano durante 20 segundos (Figura 4l) y extraerlo (Figura 4m) pero con traslado inmediato al criostato para proceder a la obtención de los cortes.

El tiempo de congelación varía según los diferentes autores (8 a 40 segundos) o bien porque utilicen otro mediador distinto al isopentano como acetona y hielo seco o Freon 22.

3. Corte en criostato (Figuras 4 n-p):

- La temperatura ideal para cortar músculo esquelético es de -20°C, aunque en aquellas muestras que incluyan abundante tejido adiposo o tejido fibroso resulta mejor cortar a -22°C⁴⁰.
- El soporte de corcho con la muestra serán montados sobre los soportes metálicos del criostato mediante OCT® y esperaremos a que quede solidificado y estable (Figura 4n). Tras lo cual lo fijamos en el portabloques del brazo y lo orientamos con respecto a la cuchilla (Figura 4o).
- Seguidamente procedemos a rebajar la superficie de corte hasta que sea lisa y uniforme y realizaremos los cortes del músculo, siendo recomendables de 8-10 µm para histoquímica y de 4-6 µm⁴¹ o 5-7 µm²² para inmunohistoquímica. Para estudios citoquímicos de pequeñas estructuras como las placas neuromusculares se recomiendan secciones de 2 µm³⁵. En el caso de que se tenga como objetivo estudiar la inervación del músculo esquelético con técnicas de impregnación argéntica el grosor de los cortes debe oscilar entre 50-100 µm⁴².
- Los cortes se recogen de la superficie de la cuchilla por aproximación del portaobjetos al que quedan adheridos por la diferencia de temperatura (Figura 4p). Los portaobjetos se mantienen fuera del criostato y sólo se introducen en él cuando vayamos a recoger el corte, tomando sólo aquellas secciones no arrugadas.
- Durante la obtención de los cortes las cajas de almacenamiento de portaobjetos se pueden mantener fuera del criostato para favorecer el secado del tejido en el portaobjetos y reducir la aparición

Figura 4. (a-f) Secuencia del montaje de bloques para congelación. (b-l) Secuencia del procedimiento de congelación en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. (m-r) Secuencia de obtención de cortes en criostato y almacenaje de portas y bloques.



de artefactos por despegamiento en el momento de realizar las técnicas (especialmente histoquímicas).

4. Almacenamiento de bloques y cortes (Figuras 4 q-r):

Los portaobjetos se almacenarán en cajas (de 25 cortes, número suficiente para la realización de las diferentes técnicas de tinción) (Figura 4q) dentro de un congelador (-20°C) hasta el momento de realizar las tinciones histológicas, histoquímicas o inmunohistoquímicas. Antes de proceder a la tinción de los cortes, los portaobjetos deben secarse a temperatura ambiente durante unos 30 minutos.

Los bloques congelados en sus soportes de corcho pueden almacenarse a -70°C por un tiempo ilimitado, pudiendo ser de nuevo cortados (para lo que precisarán aclimatarse al menos durante 20-30 minutos a la temperatura del criostato -20°C), y retienen su capacidad para ser teñidos con técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas dando resultados satisfactorios, incluso décadas después de su proceso inicial de congelación⁴³. En nuestro laboratorio, para el almacenamiento de los bloques (ya sea a -20°C o a -70°C) procedemos a envolverlos en Parafilm® con lo que evitamos que se dessequen y puedan ser cortados en el criostato en cualquier momento (Figura 4r).

¿Qué hacer si no se dispone de equipamiento y medios para el procesado por congelación?

En este caso el procedimiento a seguir debe ser el general para la mayoría de los estudios en histología: el procesado por la técnica histológica general. Básicamente consiste en fijarla por inmersión en un frasco que contenga formol al 10% y por un tiempo de 24 horas, inclusión en parafina y obtención de cortes (5µm de grosor) en un microtomo. Los cortes, recogidos en portaobjetos de vidrio, pueden ser almacenados indefinidamente hasta la realización de los protocolos de tinción, para lo cual deberán ser previamente desparafinados e hidratados.

Aunque este procedimiento genera artefactos importantes, no invalida su utilidad por completo para el análisis de la histología muscular. Por otro lado, aunque no permite la realización de técnicas histoquímicas enzimáticas, si es posible conseguir la identificación de tipos de fibras mediante técnicas inmunohistoquímicas empleando anticuerpos monoclonales frente a miosinas lenta y rápida⁴⁴.

Preparación de muestras para microscopía electrónica

Los principales inconvenientes del examen con microscopía electrónica se refieren a la gran carga de trabajo que supone la preparación de las muestras y a su elevado coste. Ambas razones son argumentadas para su no utilización, siendo sustituida su información por técnicas de marcaje de los diferentes elementos constitutivos de la fibra muscular y de otros elementos. Sin embargo, en nuestra opinión, la información obtenida en el estudio ultraestructural complementa y amplía la anterior pero no la sustituye. El empleo de este tipo de microscopía obedece a la necesidad de analizar las características subcelulares o ultraestructurales de los elementos constitutivos del músculo esquelético, especialmente en el terreno de la investigación donde se precisa una muy buena visualización de la estructuras (Tabla 2). El procedimiento es como sigue:

Tallado y fijación (Figuras 5 a-f)

En el momento de la recepción de la muestra, se debe guardar un pequeño fragmento (de no más de 5 mm de grosor) para su procesamiento en microscopía electrónica de transmisión. A continuación se introducen en un pocillo con suero fisiológico (o tampón fosfato)

Tabla 2. Objetivos de análisis en el estudio ultraestructural.

Microscopía electrónica: estudio ultraestructural
<p>Rasgos citológicos generales de las fibra muscular:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lámina basal y membrana plasmática. - Mionúcleos. - Miofibrillas. - Citoesqueleto. - Mitocondrias. - Retículo sarcoplásmico y sistema T. - Inclusiones: glucógeno, gotas lipídicas. - Áreas específicas: <ul style="list-style-type: none"> • Placa motora. • Unión miotendinosa. <p>Células satélites.</p> <p>Intersticio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Capilares. - Pericitos. - Células intersticiales: histiocitos, fibroblastos. - Fibras nerviosas.

durante 2-5 minutos para impedir que las miofibrillas aparezcan hipercontraídas por artefacto.

Este fragmento será troceado en pequeños cubos de 2 mm de largo por 1 mm de ancho (Figura 5a). A continuación estos son transferidos a un pequeño tubo en el que se cubren con glutaraldehído al 2,5% (Figura 5b). El pequeño tamaño obedece a la necesidad de que el fijador penetre suficientemente en el tejido. Las piezas deberán estar fijadas como mínimo 48 horas (y como máximo 2 semanas) y se recomienda que durante la fijación las muestras se mantengan en frío a 4°C. Transcurrido este tiempo el fijador debe ser sustituido por tampón fosfato (Figura 5c) y guardadas en frigorífico (4°C ya que la baja temperatura retrasa los procesos de autólisis celular y los cambios anóxicos que suelen ocurrir antes de la fijación en las partes más profundas de la muestra²⁷. Posteriormente se realizará una refijación con tetróxido de osmio. Para enviar las muestras es mejor emplear tubos tipo eppendorf con cierre hermético.

Inclusión en resinas sintéticas preparación de bloques (Figura 5d)

Siguiendo procedimientos estandarizados^{22,38,45} las muestras serán incluidas en resinas sintéticas del tipo araldita/epon. Tras la polimerización y desmolde de las cápsulas de inclusión (Figura 5d), los bloques son tallados antes de proceder a cortarlos.

Obtención de cortes semifinos y ultrafinos (Figura 5f)

Empleando un ultramicrotomo se obtienen dos tipos de cortes: semifinos (0,5-1 micra) y ultrafinos (50-60 nanómetros). Los primeros se recogen en portaobjetos de vidrio y son teñidos con azul de toluidina o bien con parafenileno-diamina para su evaluación previa en microscopía de luz; la ventaja de este tipo de cortes es que ofrece una visión análoga a una microscopía electrónica a muy bajo aumento con la ventaja de disponer de un área de estudio mucho más grande que en microscopía electrónica de transmisión. Además, nos permite seleccionar aquellos cortes y áreas de interés para su posterior análisis ultraestructural²⁷. Los segundos se recogerán en rejillas de cobre para su contraste (o "tinción") con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes ultrafinos se analizarán en un microscopio electrónico de transmisión; se recomienda que para el análisis ultraestructural se estudien preferentemente cortes longitudinales.

Figura 5. Secuencia del procedimiento seguido para preparación de muestras en microscopía electrónica de transmisión.

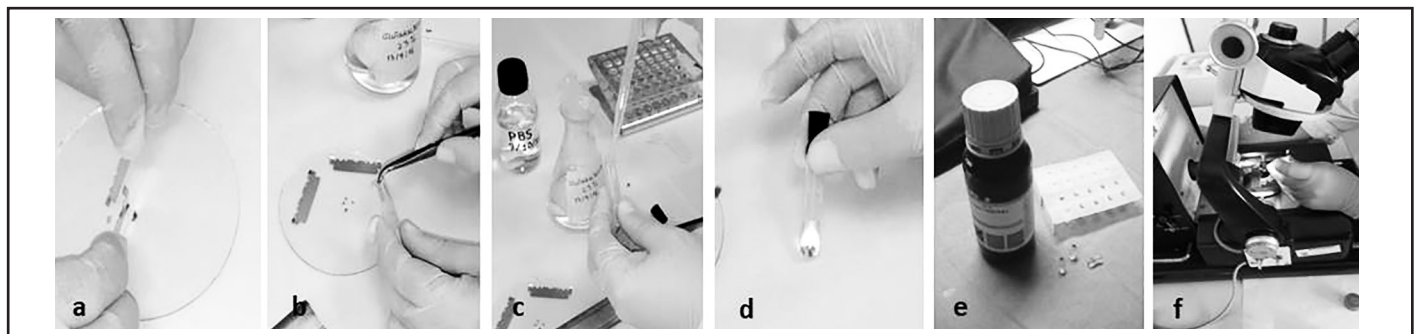
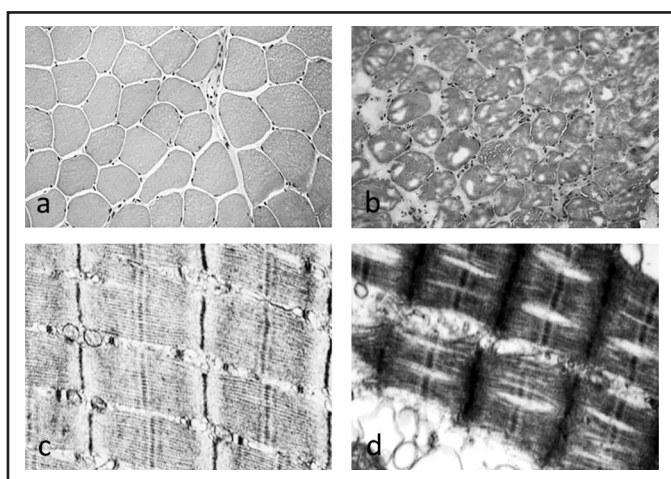


Tabla 3. Relación de recomendaciones para evitar la aparición de artefactos más habituales por errores en la metodología de preparación de muestras de músculo esquelético.

Momento del procedimiento	Recomendación "no hacer"	Consecuencias
Toma de muestra	No tomar muestras de zonas cercanas a tendón	Se sobreestima la fibrosis y el porcentaje de internalización nuclear
Toma de muestra	No tomar muestras de zonas previamente: - Biopsiadas con anterioridad - Infiltradas con anestésicos locales - Utilizadas para EMG previo	Se pueden observar fenómenos de necrosis, regeneración y reparación tisular como consecuencia de los efectos lesivos previos
Envío de la muestra al laboratorio	No enviar las muestras en formol	No permite realización de técnicas histoquímicas Análisis morfométrico no es valorable
Procesamiento por congelación	No embeber el tejido en OCT	Aparecen artefactos tipo "agujeros" en las fibras musculares más periféricas de la muestra
Procesamiento por congelación	No congelar la muestra de músculo directamente en nitrógeno líquido	Formación de cristales de hielo que rompen las fibras musculares
Almacenamiento	No almacenar las muestras sin proteger con Parafilm® en el congelador	Las muestras se desecan y no se pueden cortar
Fijación para microscopía electrónica	No mantener en suero fisiológico los fragmentos musculares antes de la fijación en glutaraldehído	Hipercontracción de miofibrillas
Fijación para microscopía electrónica	Inadecuada fijación en glutaraldehído: por exceso o por defecto	Rotura e hinchazón mitocondrial

Figura 6. Secciones transversales de músculo humano teñidos con hematoxilina-eosina, mostrando (a) una correcta congelación y (b) artefactos de congelación. Secciones longitudinales en microscopía electrónica de transmisión del interior de una fibra muscular, con (c) miofibrillas relajadas mostrando sus diferentes bandas y (d) miofibrillas artefactuadas por hipercontracción.



Artefactos

Cualquiera que precise realizar un estudio microscópico debe tener conocimiento, además de los pasos a seguir en el manejo y procesamiento histológico de muestras de cualquier tipo de tejido u órgano, de

los llamados *artefactos* (Figura 6). Los artefactos son "errores" o "defectos" que aparecen en los preparados histológicos y que son consecuencia de una inadecuada metodología o mal uso del equipamiento o aparataje. Su aparición es bastante habitual en histología y debe ser evitada ya que, no sólo puede hacer inviable un estudio, sino que pueden malinterpretarse como lesiones o pueden potencialmente enmascarar cambios patológicos subyacentes.

En el caso del músculo esquelético los artefactos son también producidos a lo largo de todo el proceso, especialmente durante la congelación, lo que puede imposibilitar no sólo el análisis sino dudar de la fiabilidad de los datos obtenidos. Esto implicaría la necesidad de repetir la toma de biopsias o un estudio con animales experimentales, situaciones ambas éticamente discutibles. En consecuencia, el conocimiento de los artefactos, su generación y cómo solucionarlos es fundamental para obtener preparados microscópicos de calidad para garantizar la máxima calidad en nuestro análisis (Tabla 3).

Conclusiones

Conocer y seguir correctamente la metodología para el procesamiento de muestras de músculo esquelético para su análisis microscópico asegura disponer de un material de buena calidad, facilitando la obtención de resultados fiables para una evaluación precisa y segura. Ésta metodología de procesamiento por congelación permite obtener muestras sobre las que aplicar una amplia batería de técnicas histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas que, con el empleo de diferentes tipos de microscopios, ofrecen una visión más completa de la histología muscular con lo que se convierten en una herramienta fundamental

para profundizar en el conocimiento de las respuestas de este órgano en el campo de la medicina y traumatología del deporte.

Bibliografía

- Hawke TJ. Muscle stem cells and exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*. 2005;33:63-8.
- Marini M, Veicsteinas A. The exercised skeletal muscle: a review. *Eur J Transl Myol*. 2010;20:105-20.
- Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports*. 2000;10:332-7.
- Eriksson A, Lindström M, Carlsson L, Thornell LE. Hypertrophic muscle fibers with fissures in power-lifters; fiber splitting or defect regeneration? *Histochem Cell Biol*. 2006;126:409-17.
- Cholewa J, Guimaraes-Ferreira L, da Silva Teixeira T, Naimo MA, Zhi X, de Sá RB, et al. Basic models modeling resistance training: an update for basic scientists interested in study skeletal muscle hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2014;229:1148-56.
- Contreras-Muñoz P, Fernández-Martín A, Torrella R, Serres X, De la Varga M, Viscor G, et al. A new surgical model of skeletal muscle injuries in rats reproduces human sports lesions. *Int J Sports Med*. 2016;37:183-90.
- Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvin G, Briand D, Thépenier C, et al. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One*. 2016;11:e0147198.
- Da Silva ME, Peña J. Mecanismos de formación de nuevas fibras en el músculo esquelético. *Arch Med Deporte*. 2004;21:329-36.
- Järvinen TAH, Järvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2013;3:337-45.
- Bellamy LM, Joannisse S, Grubb A, Mitchell CJ, McKay BR, Phillips SM, et al. The acute satellite cell response and skeletal muscle hypertrophy following resistance training. *PLoS One*. 2014;9:e109739.
- Deschenes MR, Sherman EG, Roby MA, Glass EK, Harris MB. Effect of resistance training on neuromuscular junctions of young and aged muscles featuring different recruitment patterns. *J Neurosci Res*. 2015;93:504-13.
- Curzi D, Saratini S, Guescini M, Lattanzi D, Di Palma M, Ambrogini P, et al. Effect of different exercise intensities on the myotendinous junction plasticity. *PLoS One*. 2016;11:e0158059.
- Kadi F, Eriksson A, Holmner S, Thornell LE. Effects of anabolic steroids on the muscle cells of strength-trained athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 1999;31:1528-34.
- Apolinário LM, De Carvalho SC, Santo Neto H, Marques MJ. Long-term therapy with omega-3 ameliorates myonecrosis and benefits skeletal muscle regeneration in mdx mice. *Anat Rec (Hoboken)*. 2015;298:1589-96.
- Mackey AL, Mikkelsen UR, Magnusson SP, Kjaer M. Rehabilitation of muscle after injury - the role of anti-inflammatory drugs. *Scand J Med Sci Sports*. 2012;22:e8-14.
- Murach KA, White SH, Wen Y, Ho A, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Differential requirement for satellite cells during overload-induced muscle hypertrophy in growing versus mature mice. *Skelet Muscle*. 2017;7:e14.
- Ota S, Uehara K, Nozaki M, Kobayashi T, Terada S, Tobita K, et al. Intramuscular transplantation of muscle-derived stem cells accelerates skeletal muscle healing after contusion injury via enhancement of angiogenesis. *Am J Sports Med*. 2011;39:1912-22.
- Goebel HH, Stenzel W. Practical application of electron microscopy to neuromuscular diseases. *Ultrastruct Pathol*. 2013;37:15-8.
- Pasut A, Jones AE, Rudnicki MA. Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle. *J Vis Exp*. 2013;73:e50074.
- Purslow PP, Trotter JA. The morphology and mechanical properties of endomysium in series-fibred muscles: variations with muscle length. *J Muscle Res Cell Motil*. 1994; 15:299-308.
- Meng, H, Janssen, PM, Grange, RW, Yang L, Beggs AH, Swanson LC, et al. Tissue triage and freezing for models of skeletal muscle disease. *J Vis Exp*. 2014;89:e51586.
- Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A. *Muscle biopsy. A practical approach*. Fourth edition. Philadelphia. Saunders Elsevier; 2013. p 3.
- Joyce NC, Oskarsson B, Jin LW. Muscle biopsy evaluation in neuromuscular disorders. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2012;23:609-31.
- Lacom D. The use of percutaneous needle muscle biopsy in the diagnosis of myopathy. *Curr Rheumatol Rep*. 2002;225-9.
- Caldow MK, Thomas EE, Dale MJ, Tomkinson GR, Buckley JD, Cameron-Smith D. Early myogenic responses to acute exercise before and after resistance training in young men. *Physiol Rep*. 2015;3:e12511.
- Eklom B. The muscle biopsy technique. Historical and methodological considerations. *Scand J Med Sci Sports*. 2017;27:458-61.
- Engel AG. The muscle biopsy. En: *Myology. Basic and Clinical*. New York: McGraw-Hill Inc.; 2004. p. 681-690.
- Shanely RA, Zwetsloot KA, Triplett NT, Meaney MP, Farris GE, Nieman DC. Human skeletal muscle biopsy procedures using the modified Bergström technique. *J Vis Exp*. 2014;91:e51812.
- Anderson JR. Recommendations for the biopsy procedure and assessment of skeletal muscle biopsies. *Virchows Arch*. 1997;431:227-33.
- Eriksson O, Eriksson A, Ringqvist M, Thornell LE. The reliability of histochemical fibre typing of human necropsy muscles. *Histochemistry*. 1980;65:193-205.
- Swash M, Schwartz MS. *Biopsy Pathology of Muscle*. New York: Springer US; 1991. p. 15-37.
- Luque E, Ruz-Caracuel I, Medina FJ, Leiva-Cepas F, Agüera E, Sánchez-López, et al. Skeletal muscle findings in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Pathol Res Pract*. 2015;211:493-504.
- Jiménez-Díaz F, Jimena I, Luque E, Mendizábal S, Bouffard A, Jiménez-Reina L, et al. Experimental muscle injury: correlation between ultrasound and histological findings. *Muscle Nerve*. 2012;45:705-712.
- Gracia Bragado F. La biopsia muscular. Aspectos prácticos. En: Guerra Merino I. *Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España*. Vitoria-Gasteiz: Sociedad Española de Anatomía Patológica; 2015. p. 219-24.
- Goss GR, Prayson RA, Pavloski PS. Delayed processing of muscle biopsy specimens: does it really compromise enzyme histochemistry? *J Histotechnol*. 1998;21:305-8.
- Horkayne-Szakaly I, Sandberg GD, Keylock J, Rushing EJ. Nonfrozen transport medium preserves and restores skeletal muscle enzymatic activity and morphology. *J Histotechnol*. 2009;32:49-53.
- Saperstein DST. Muscle histochemistry: routine techniques and their clinical use. *J Histotechnol*. 2007;30:249-56.
- Sarnat HB. *Muscle pathology & histochemistry*. Chicago. American Society of Clinical Pathology Press; 1983. p.1.
- Coleman R. In search of perfect frozen sections. *Acta Histochem*. 2013;115:195-7.
- Weller R. Muscle biopsy and the diagnosis of muscle disease. En: Anthony PP and MacSwineen RNM. *Recent advances in histopathology*. New York: Churchill Livingstone; 1984. p. 259-88.
- Carpenter S, Karpati G. *Pathology of Skeletal Muscle*, 2nd ed. New York. Oxford University Press; 2001. p. 39.
- Kiernan JA. Review of current silver impregnation: techniques for histological examination of skeletal muscle innervation. *J Histotechnol*. 1996;19:257-67.
- Mitchell JA, Waclawik AJ. Muscle biopsy in diagnosis of neuromuscular disorders: the technical aspects, clinical utility, and recent advances. *J Histotechnol*. 2007;30:257-69.
- Carson NE, Gu J, Ianuzzo CD. Detection of myosin heavy chain in skeletal muscles using monoclonal antibodies on formalin fixed, paraffin embedded tissue sections. *J Histotechnol*. 1998;21:19-24.
- Cumming WJK, Fulthorpe J, Hudgson P, Mahon M. Appendices: Electron microscopical procedures. En: *Color Atlas of Muscle Pathology*. London: Mosby Wolfe; 1994. p.188.