

Aportación del patólogo al diagnóstico de las enfermedades musculares

***X Curso de Enfermedades Musculares
en la Infancia y Adolescencia***

***Mercedes García Villanueva
Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. Marzo-2013***

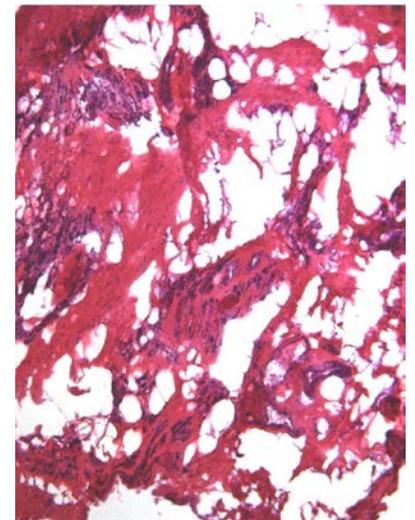
Metodología para el diagnóstico AP de las enfermedades musculares

- Gran avance en la década de los 70 del pasado siglo, destacando la importancia de la monografía de Dubowitz, Brooke y Neville en 1973 (*Muscle biopsy: a modern approach*), enfatizando la aplicación de técnicas **histoquímicas y de microscopía electrónica** en el diagnóstico de la patología muscular.
- Avance aún mayor a partir del año 1987 en el que se descubrió, por el grupo de Kunkel y Hoffman, el gen causante de la Distrofia Muscular de Duchenne y de su proteína producto, la **Distrofina**.
(Koenig M et al. Cell 1987; 50:509-517), (Hoffman EP et al. Cell 1987; 51: 919-928).
- Desde entonces se han ido caracterizando muchos genes defectuosos causantes de enfermedades musculares y la proteína producto en la mayoría de ellas, pudiéndose detectar dichas proteínas por medio de **técnicas inmunohistoquímicas y de wester-blot**.

BIOPSIA MUSCULAR

Selección del músculo a biopsiar

- *Debe ser indicado por el clínico.*
- *Preferibles cuádriceps, bíceps y gemelo.*
- *No debe realizarse la biopsia en el sitio donde se ha hecho el electromiograma ni donde se ha inyectado la anestesia.*
- *Enfermedades agudas y subagudas: Se deben biopsiar los músculos más afectados.*
- *Procesos crónicos: Músculos moderadamente afectados. No se deben biopsiar músculos con patología muy evolucionada.*



PROCESAMIENTO

El tejido muscular se enviará en fresco al Servicio de AP lo más rápidamente posible.

- **ESTUDIO ÓPTICO**

Inclusión en parafina (fijación en formol al 10%)

**Congelación*

- **ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL**

(fijación en glutaraldehído)

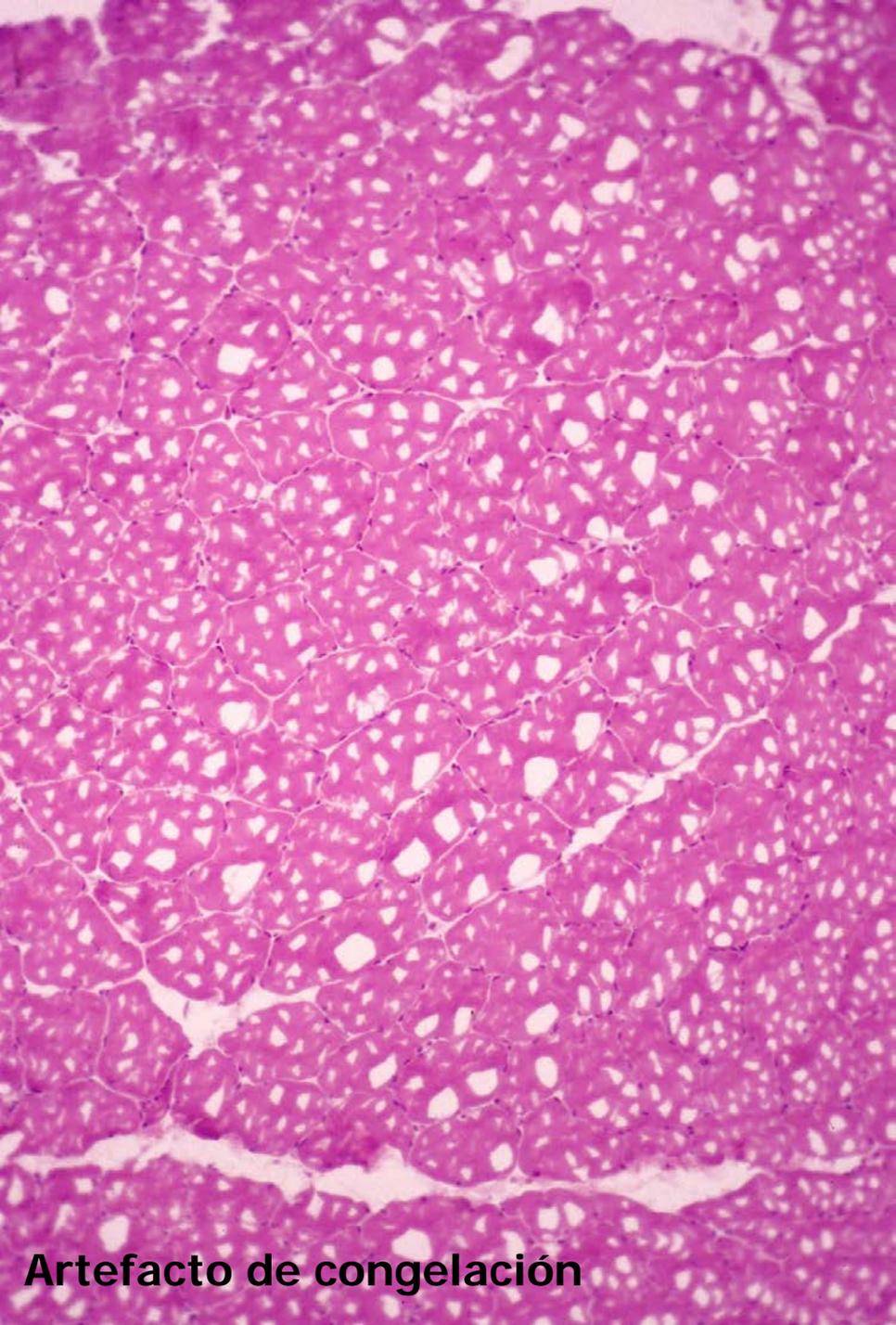
-Utilidad en miopatías congénitas y algunas miopatías metabólicas

BIOPSIA MUSCULAR

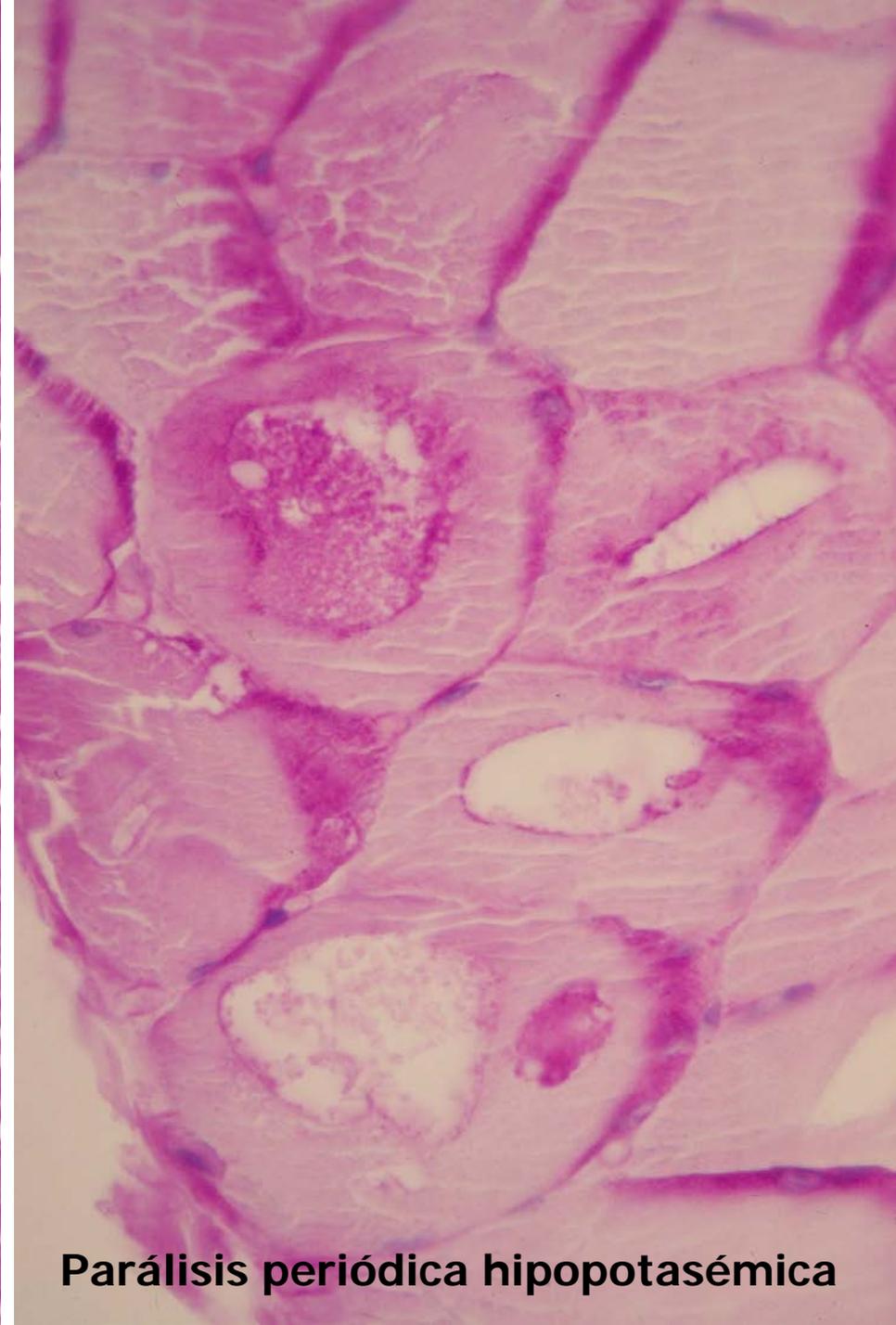
Procesamiento

- *Es fundamental la congelación del tejido en isopentano enfriado en nitrógeno líquido y su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido o en congelador a -80°C.*

- Técnicas Histológicas, Histoquímicas e Inmunohistoquímicas*
- Western blot*
- Estudios bioquímicos y genéticos*



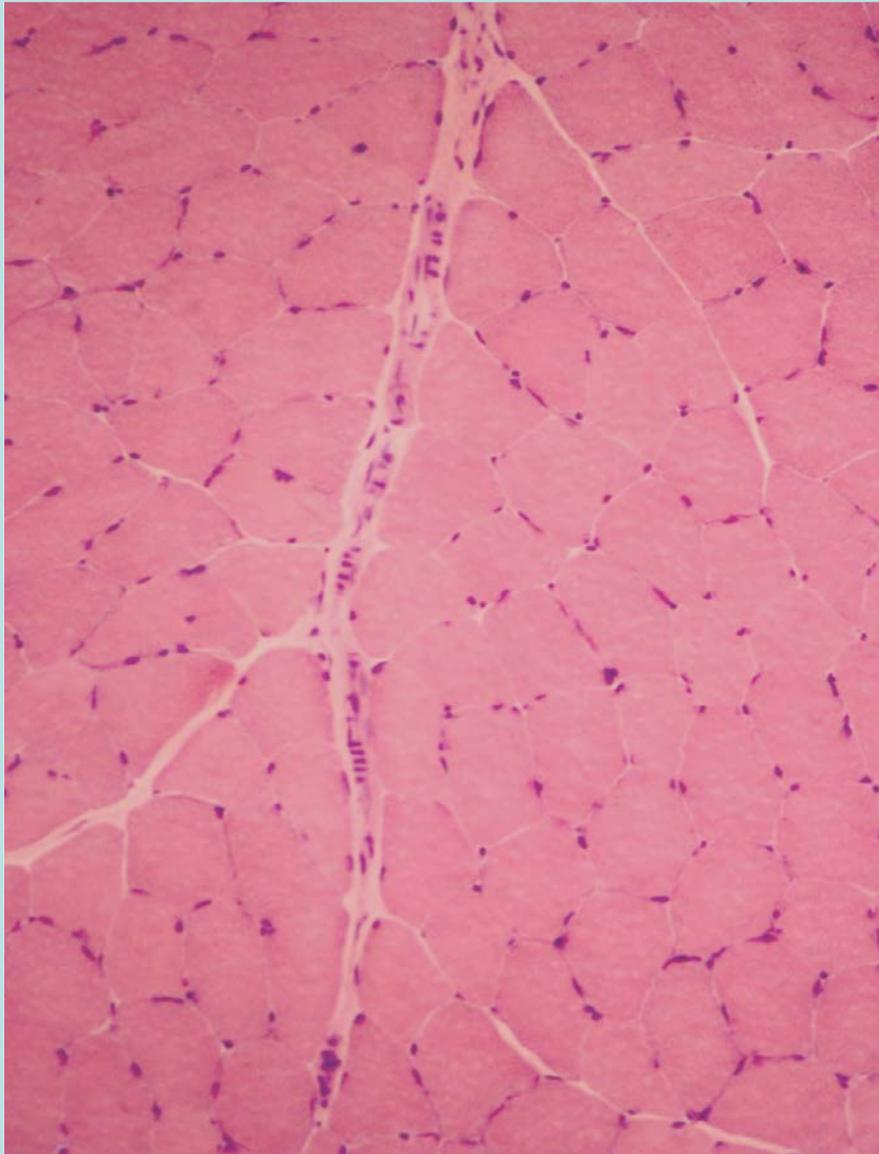
Artefacto de congelación



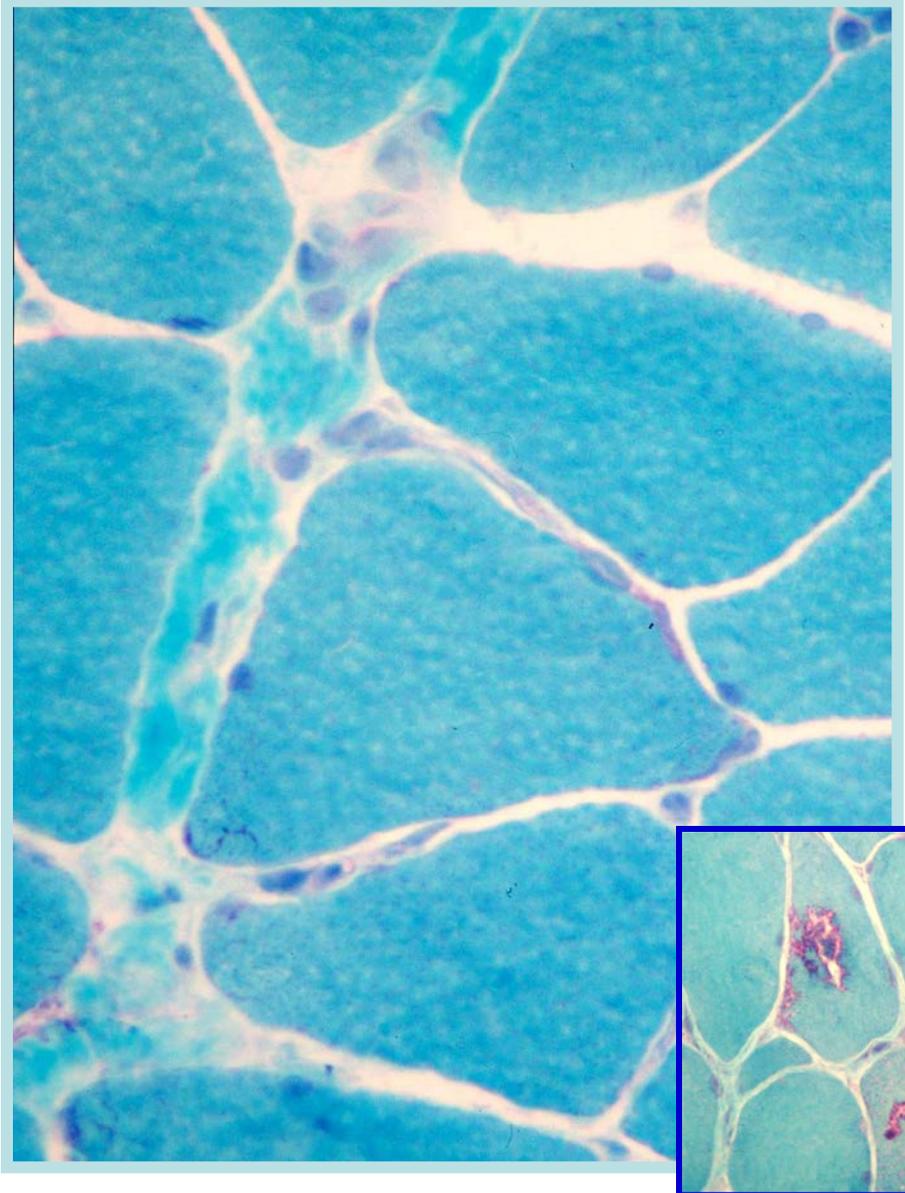
Parálisis periódica hipopotasémica

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS



Hematoxilina-eosina

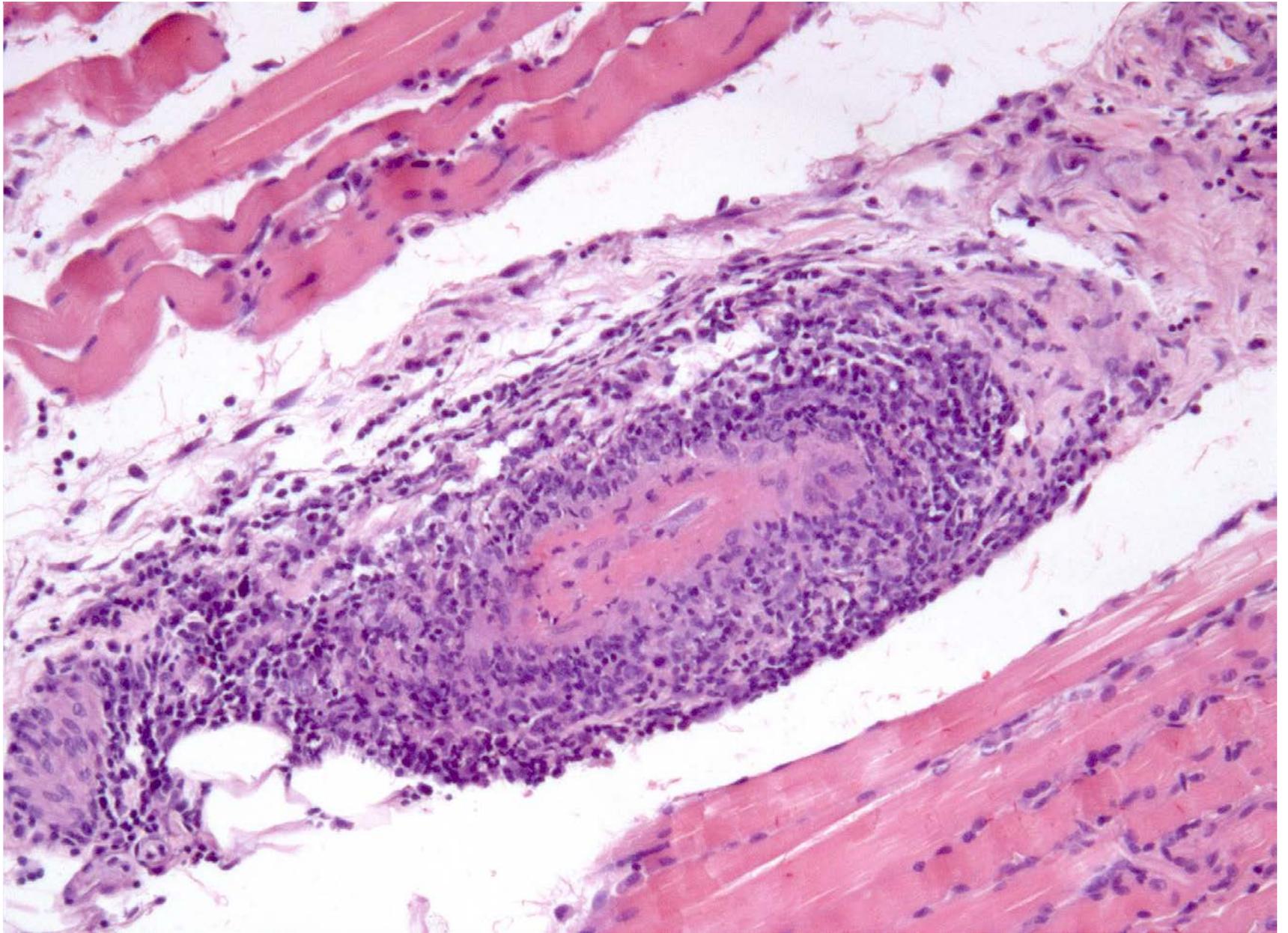


Tricrómico modificado de Gomori

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

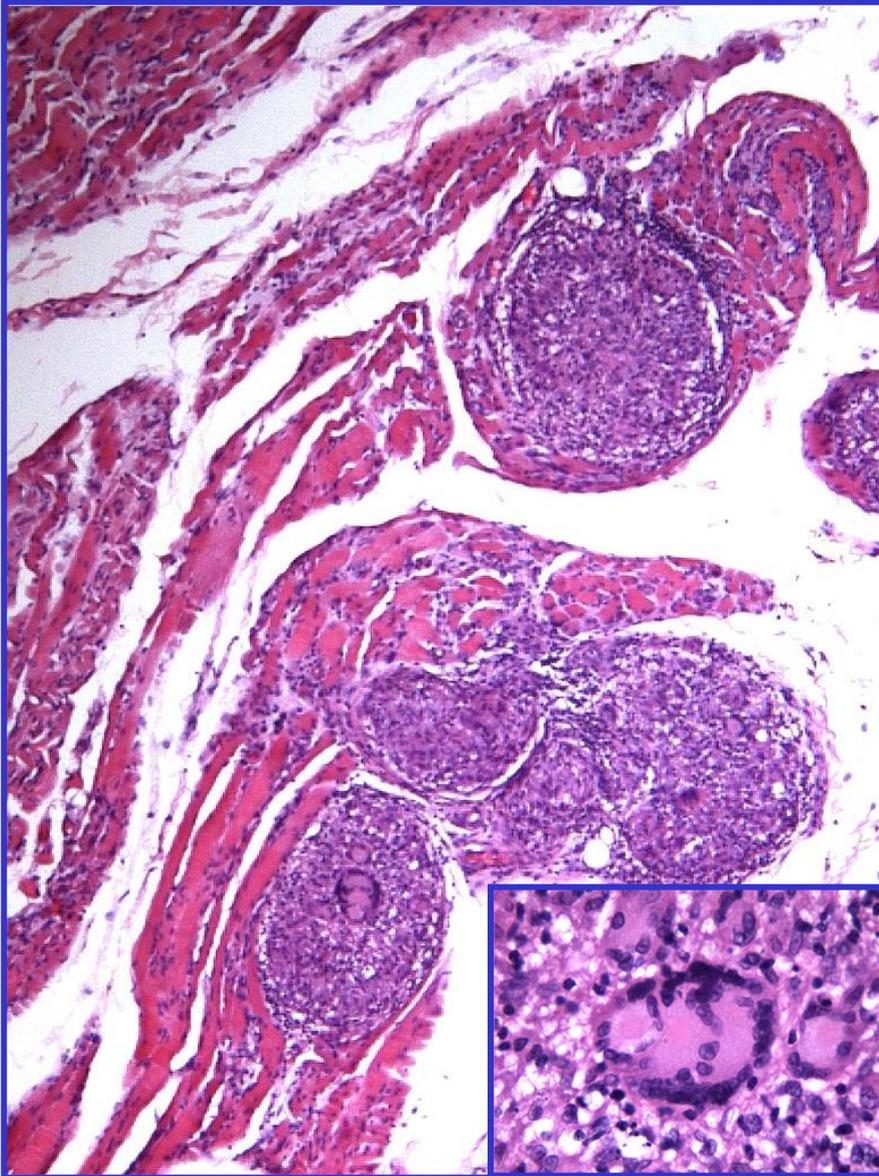
ÚTILES EN:

- *Vasculitis*
- *Miopatías inflamatorias*
- *Orientación diagnóstica en general*



Vasculitis

MIOPATÍAS INFLAMATORIAS



Sarcoidosis



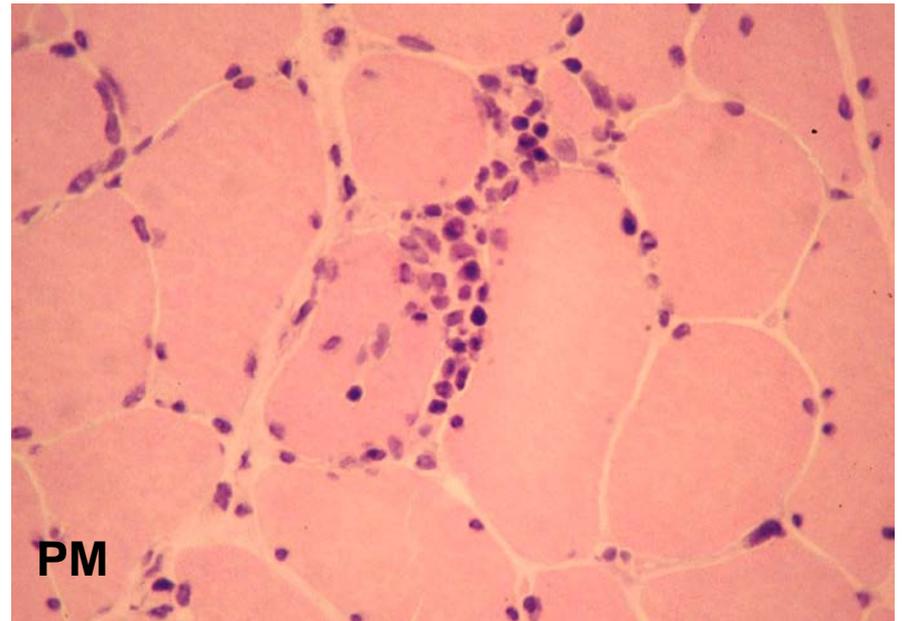
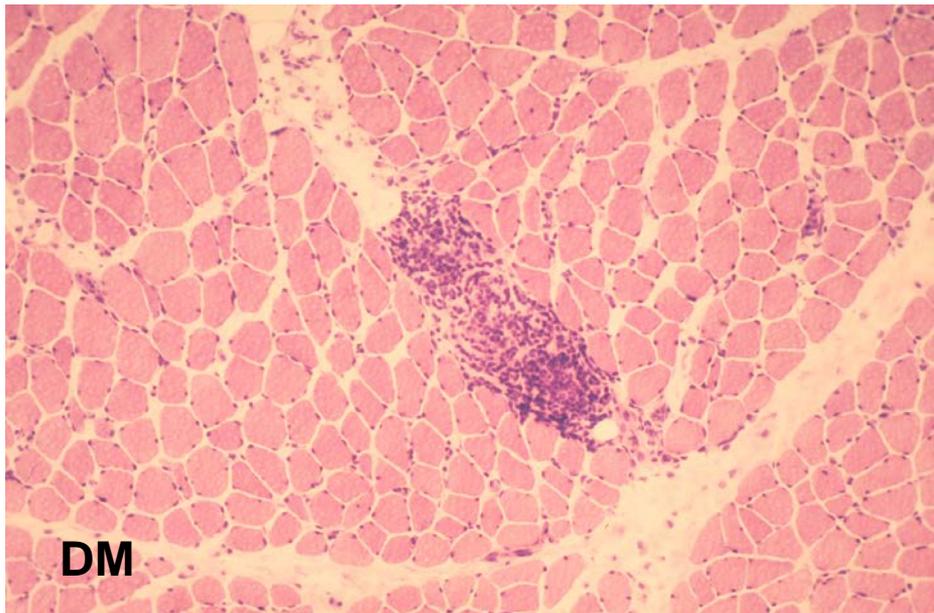
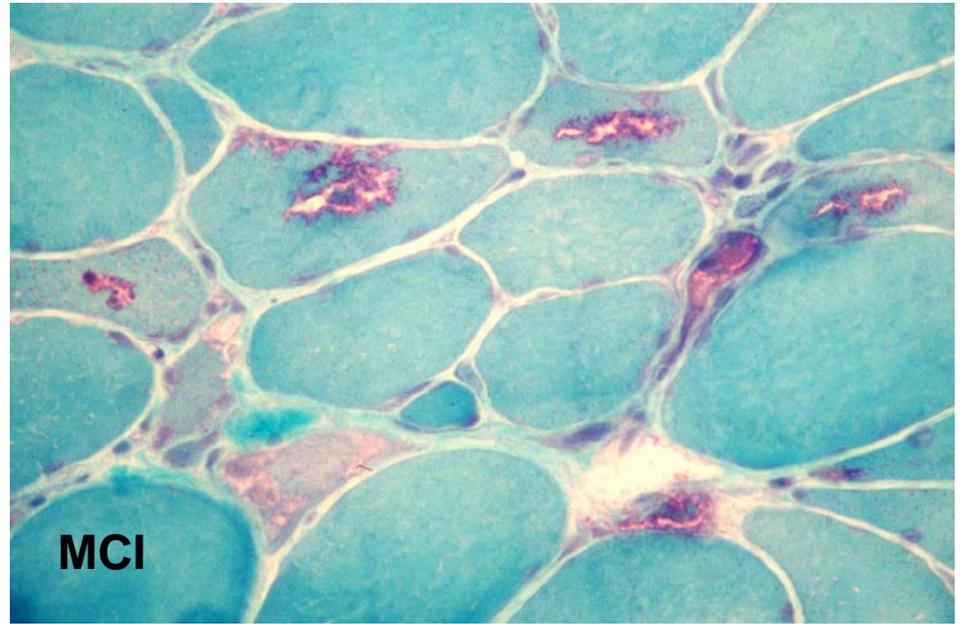
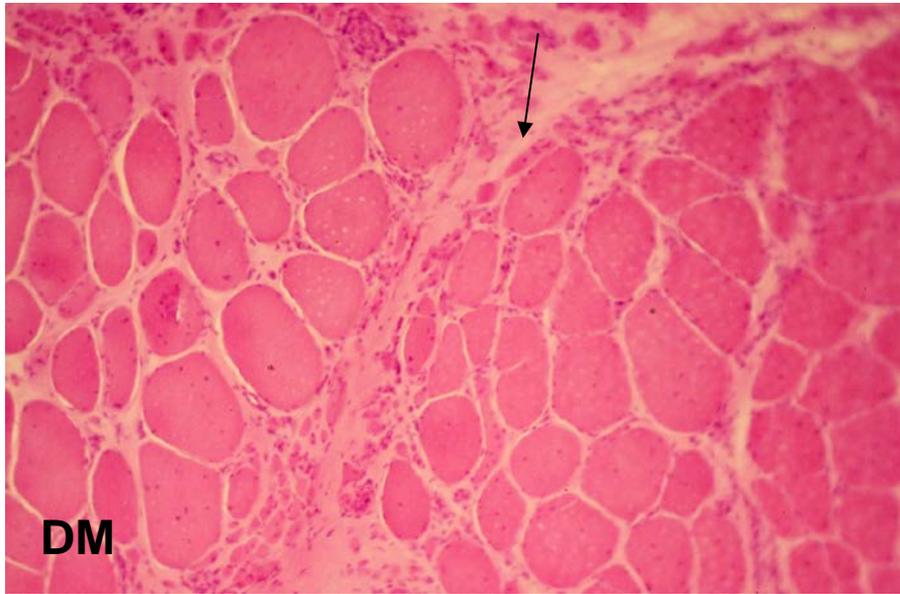
Triquinosis

MIOPATÍAS INFLAMATORIAS

DM, PM, MCI

- *Lesiones histológicas **multifocales**.*
(La ausencia de infiltrado inflamatorio en la biopsia no excluye el diagnóstico de MI)
- **Atrofia perifascicular** en la dermatomiositis (patognomónica).
Prácticamente siempre en niños. Entre el 40-50% en adultos.
- **Vacuolas ribeteadas** características de la miositis por cuerpos de inclusión (No específicas)
- **Infiltrado inflamatorio:**
 - *Características especiales en cada tipo de MI en cuanto a la localización y composición.*

MIOPATÍAS INFLAMATORIAS



MIOPATÍAS INFLAMATORIAS

- *Son raras en niños y adolescentes y no hay que olvidar que los infiltrados inflamatorios no son exclusivos de miopatías inflamatorias y **pueden verse en Distrofias Musculares:***

- DM de Duchenne
- DM de Becker
- Déficit de Lamina A/C
- Disferlinopatías
- Calpainopatías
- DM Congénita
- Distrofia facioescapulohumeral

Algunos autores proponen que durante la degeneración muscular los fragmentos de fibras alteradas pueden ser presentados por macrófagos a otras células inmunocompetentes, activando una respuesta inmune secundaria contra el tejido muscular (Confalonieri P et al. J Neuroimmunol 2003; Arahata K et al. Ann Neurol 1984)

TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

■ *De rutina*

- Técnicas de ATPasa** (Adenosín-trifosfatasa) a pH 9,4; 4,6 y 4,2.
- NADH-TR** (Nicotinamida adenina dinucleótido-TR)
- PAS**
- Oil-Red-O**

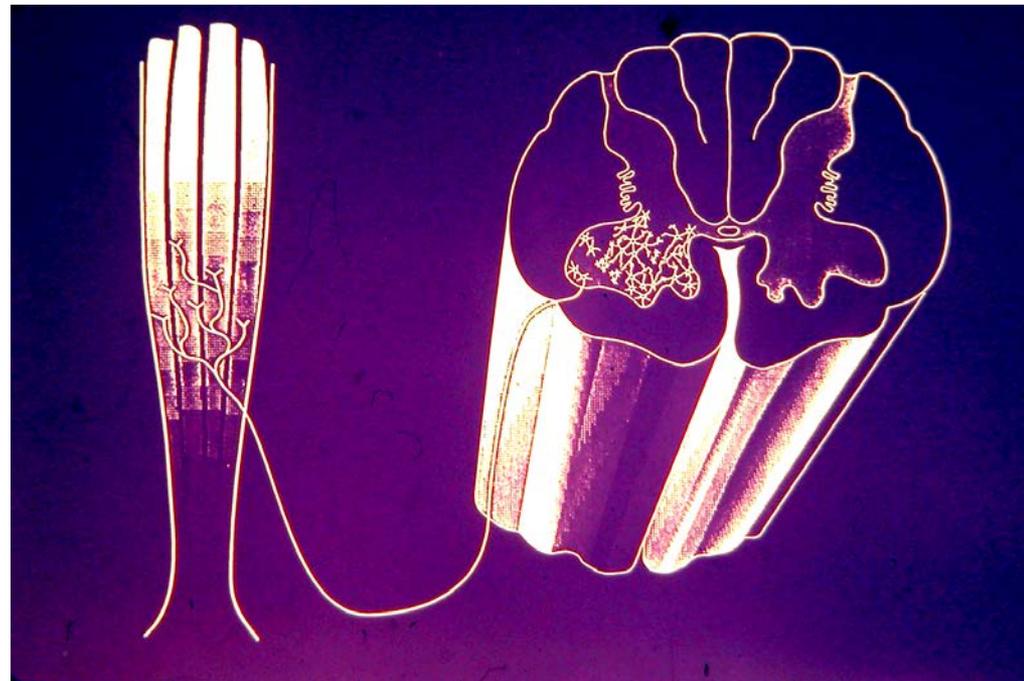
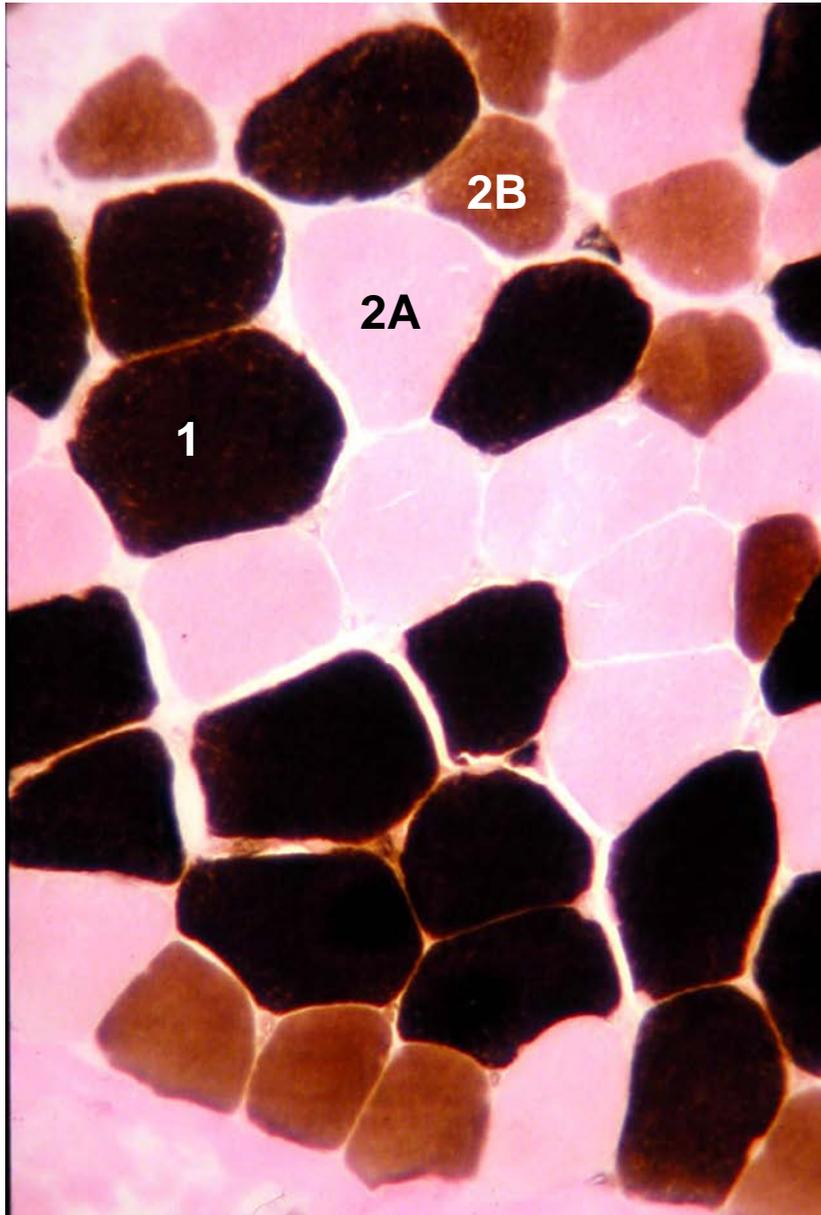
■ *Sospecha clínica de M. Mitochondrial*

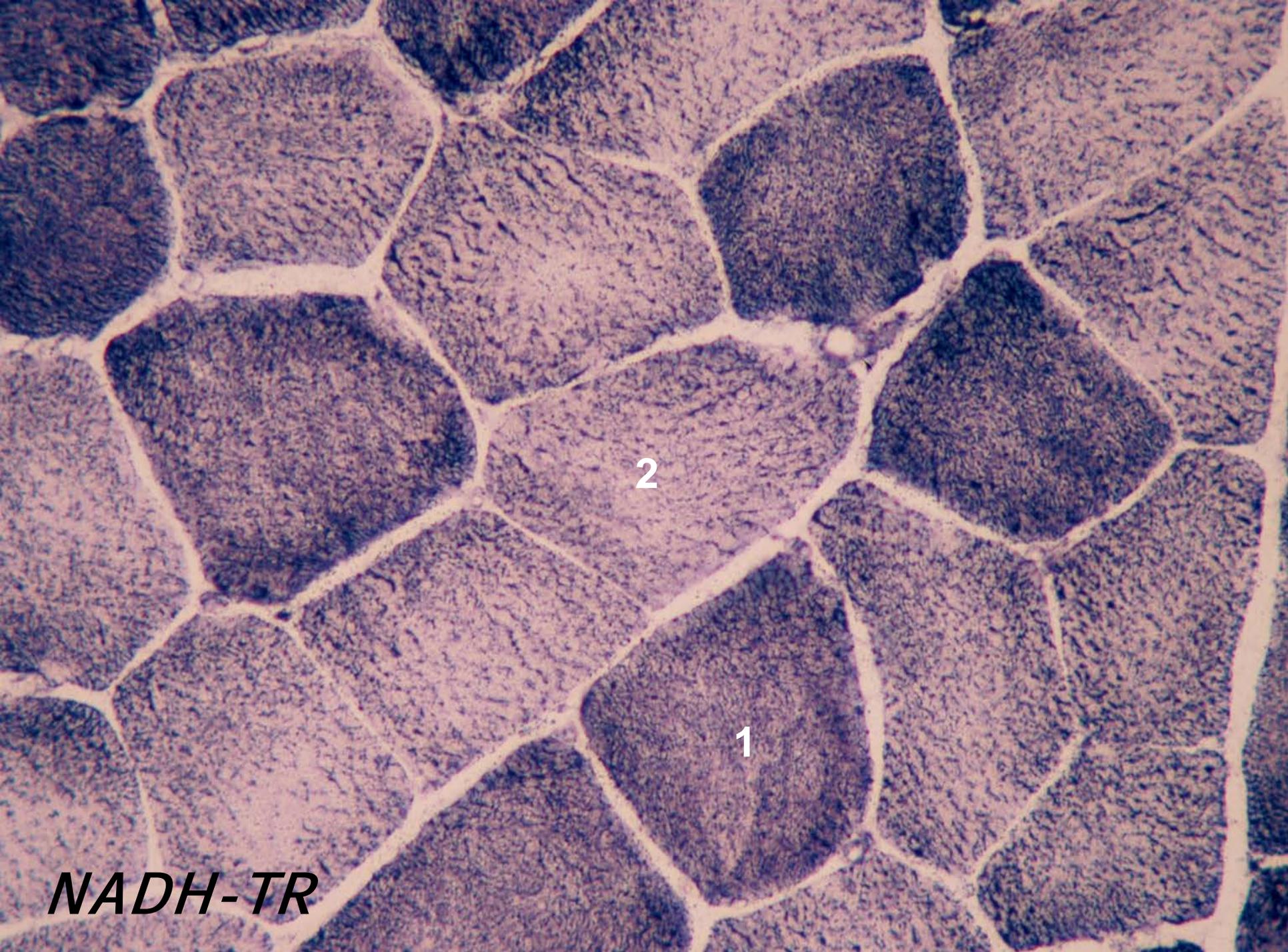
- SDH** (Succinato deshidrogenasa)
- COX** (Citocromo-oxidasa) **combinada con SDH (COX-SDH)**

■ *Sospecha clínica de glucogenosis*

- **Fosforilasa** (Glucogenosis tipo V)
- **Fosfofructoquinasa** (Glucogenosis tipo VII)

ATPasa pH 4,6

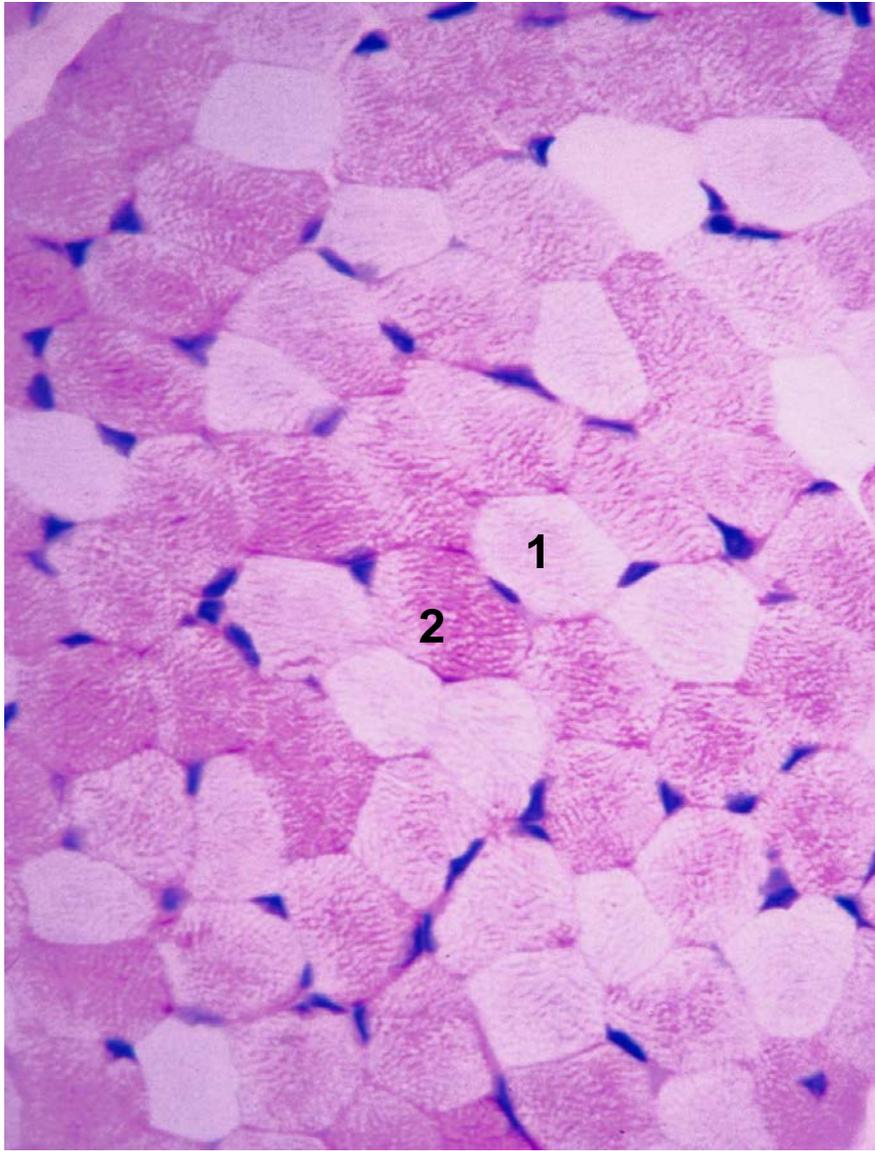




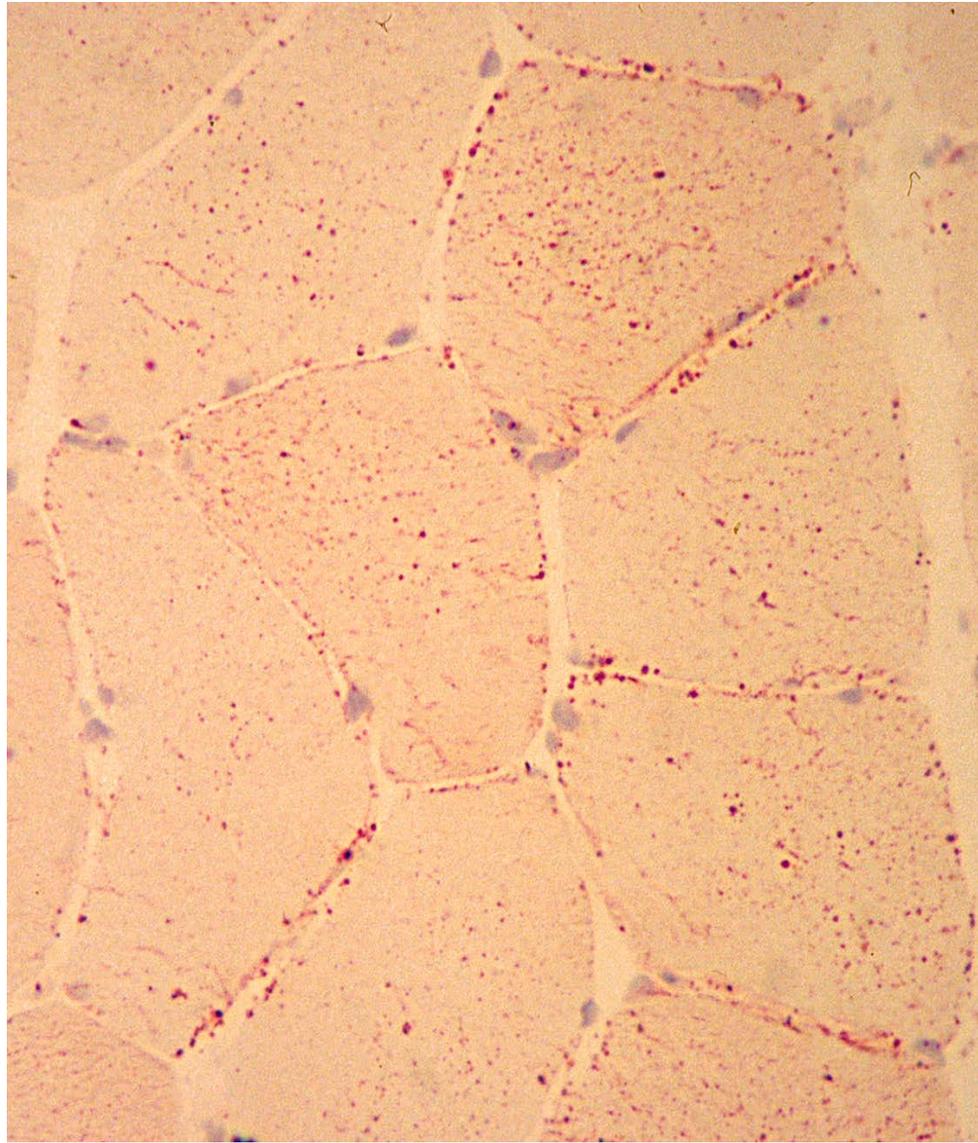
2

1

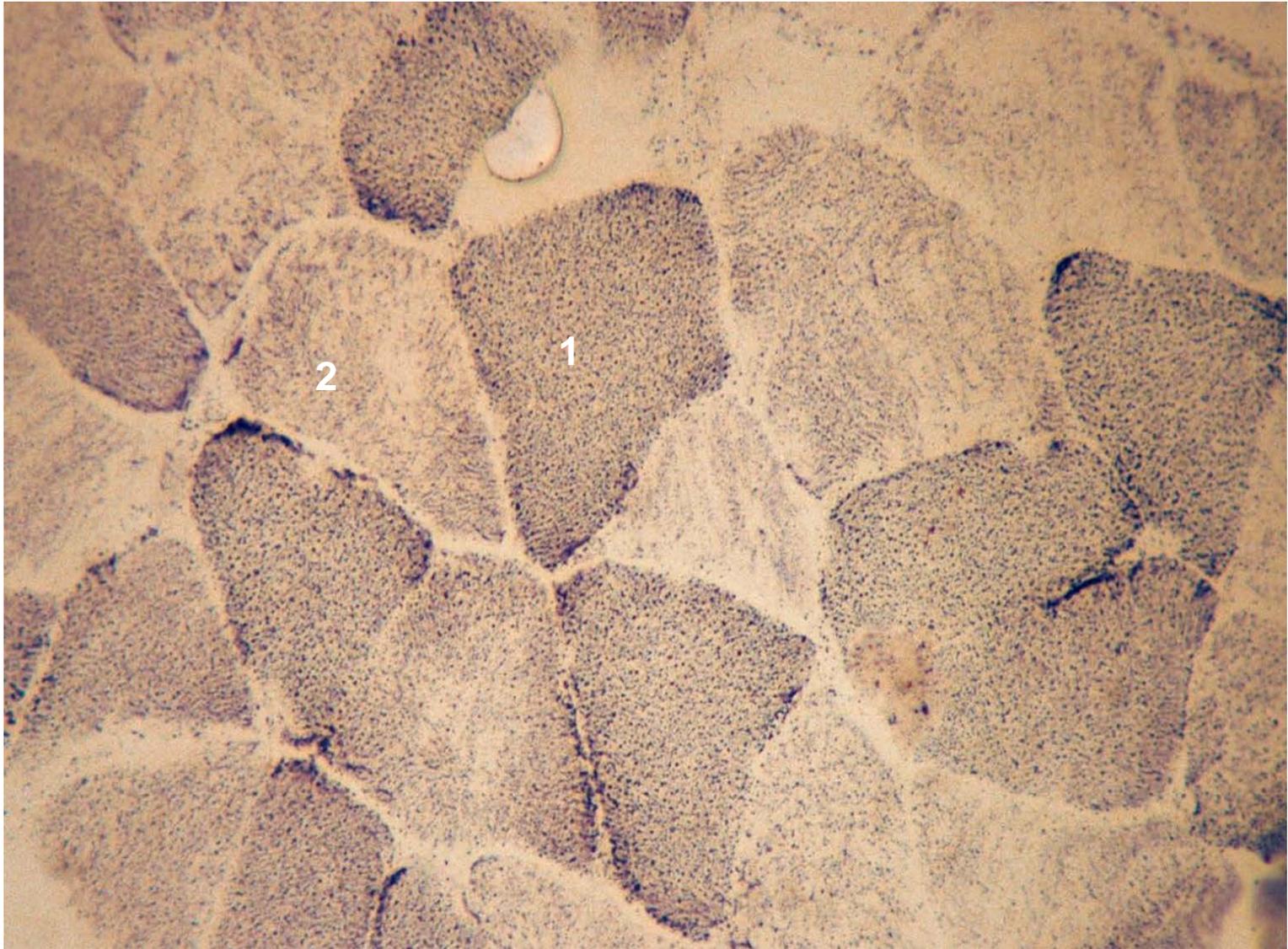
NADH-TR



PAS

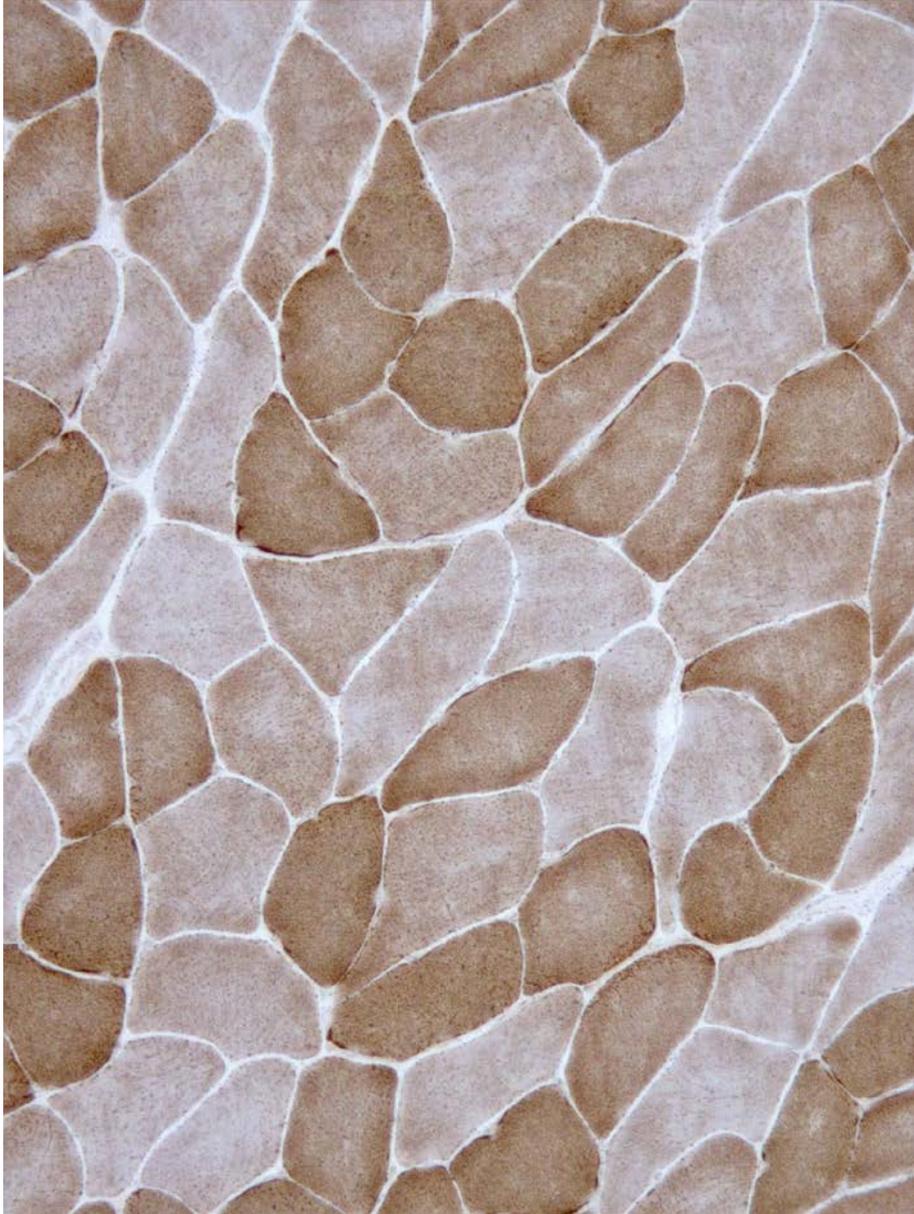


Oil-Red-O

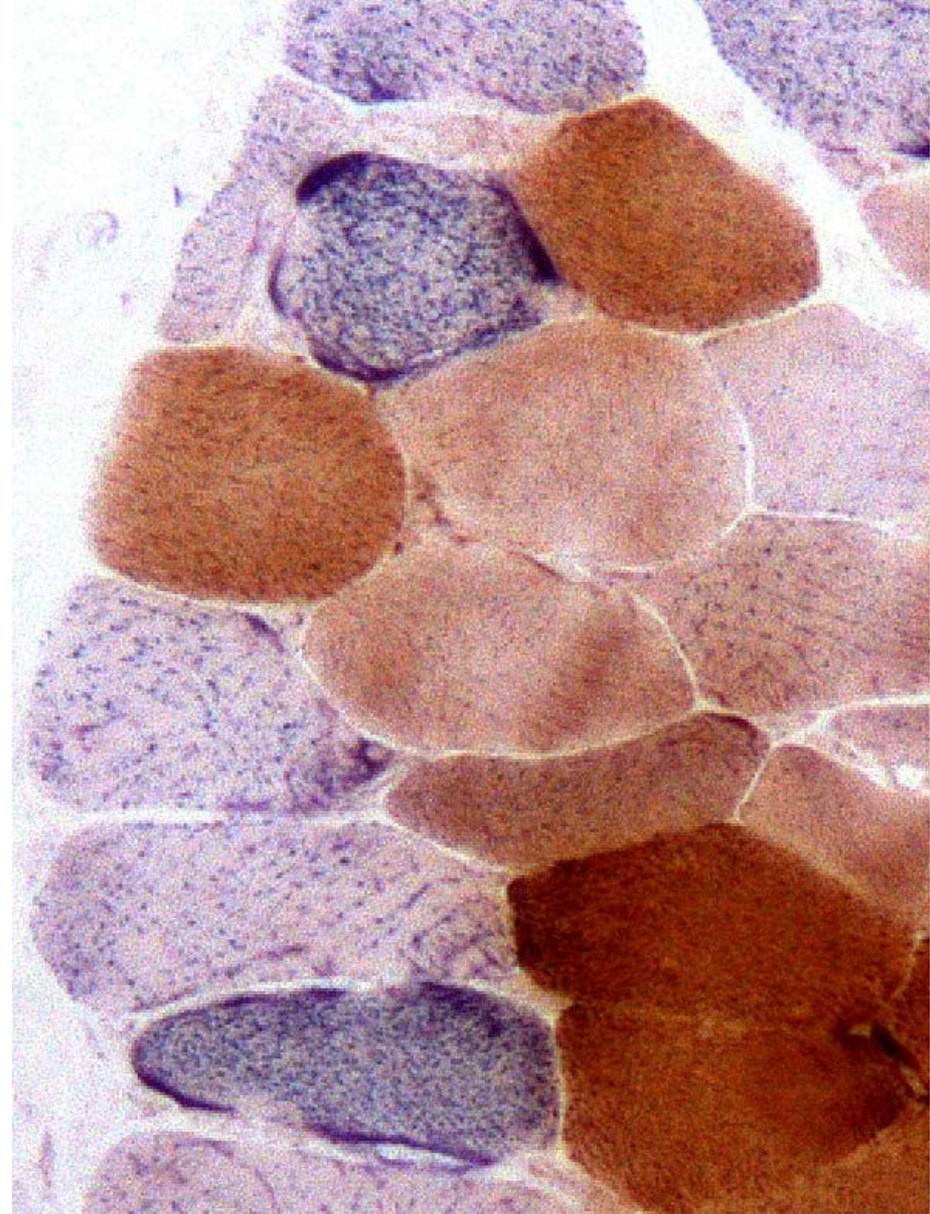


SDH

COX-SDH



Normal



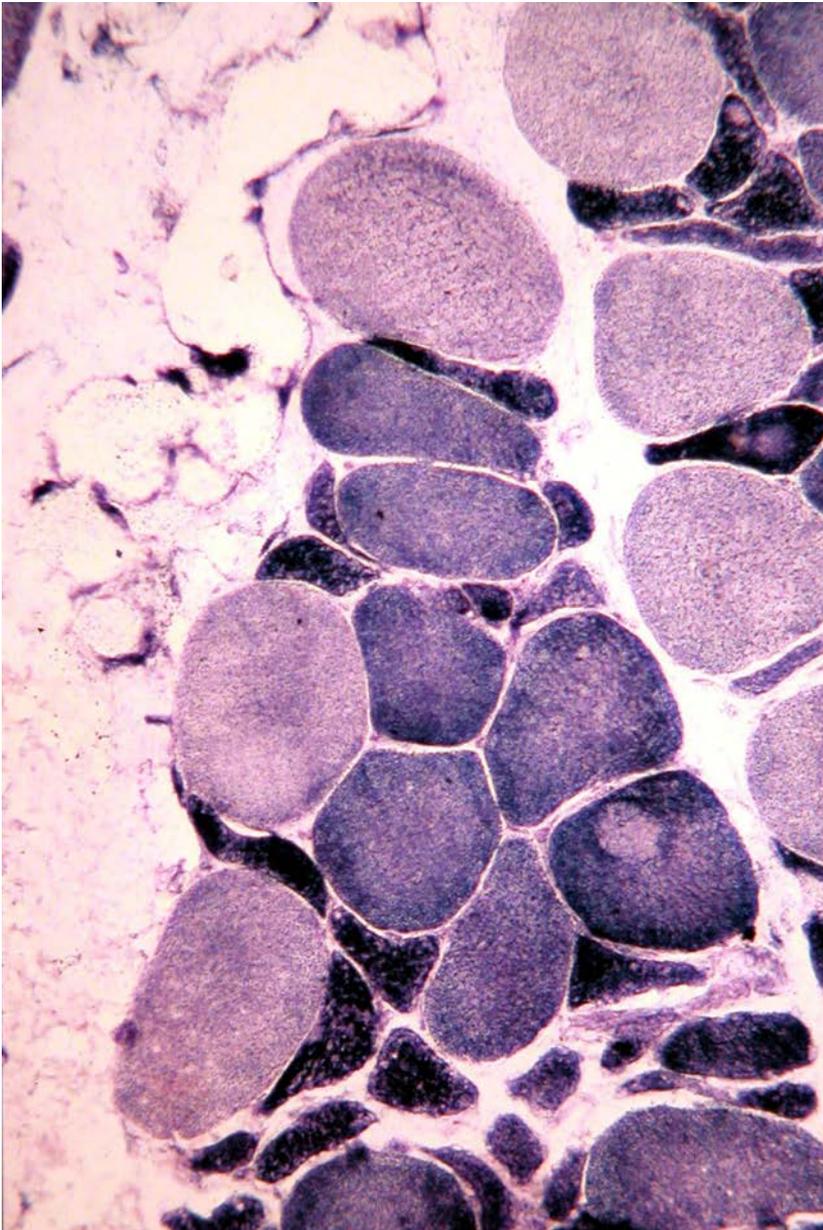
Fibras COX negativas (azules)

TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

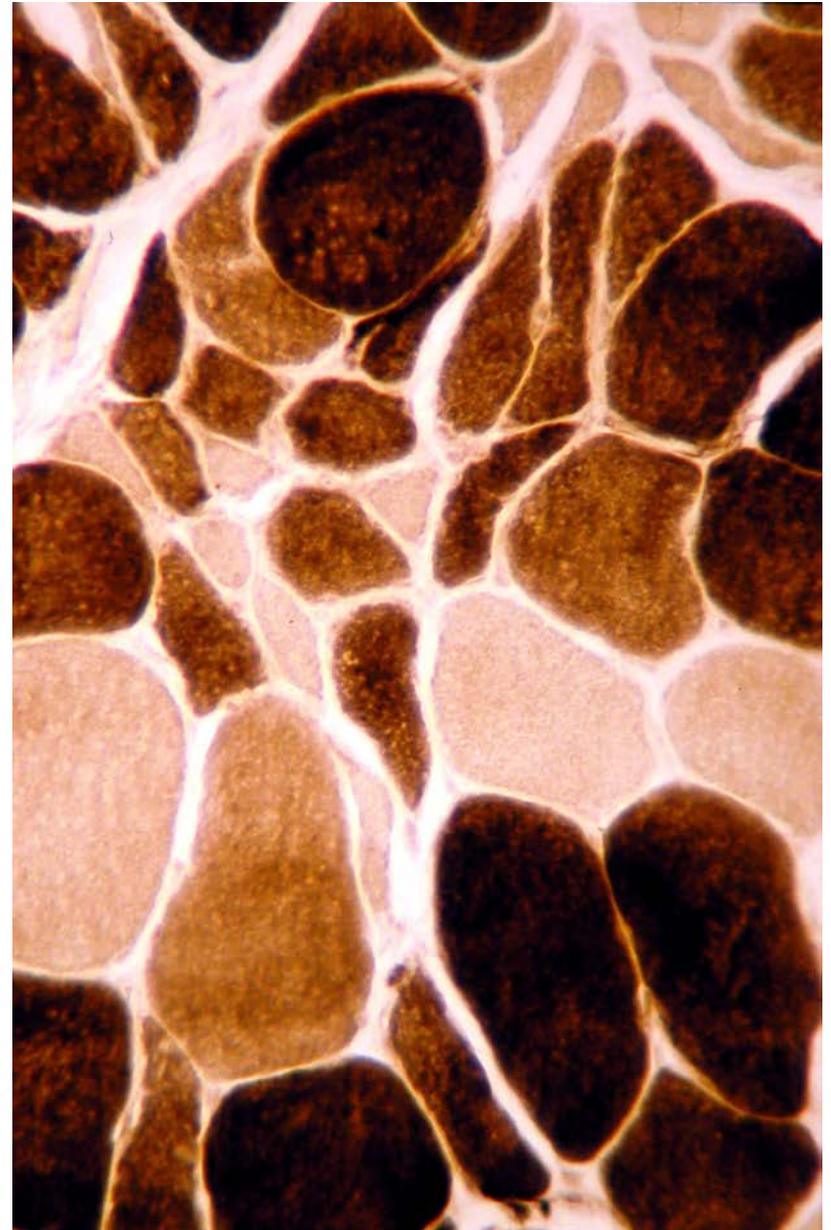
Especialmente útiles en:

- *Atrofia por denervación*
- *Miopatías congénitas (+ microscopía electrónica y estudios genéticos)*
- *Miopatías metabólicas(+ estudios bioquímicos y genéticos)*

ATROFIA POR DENERVACIÓN

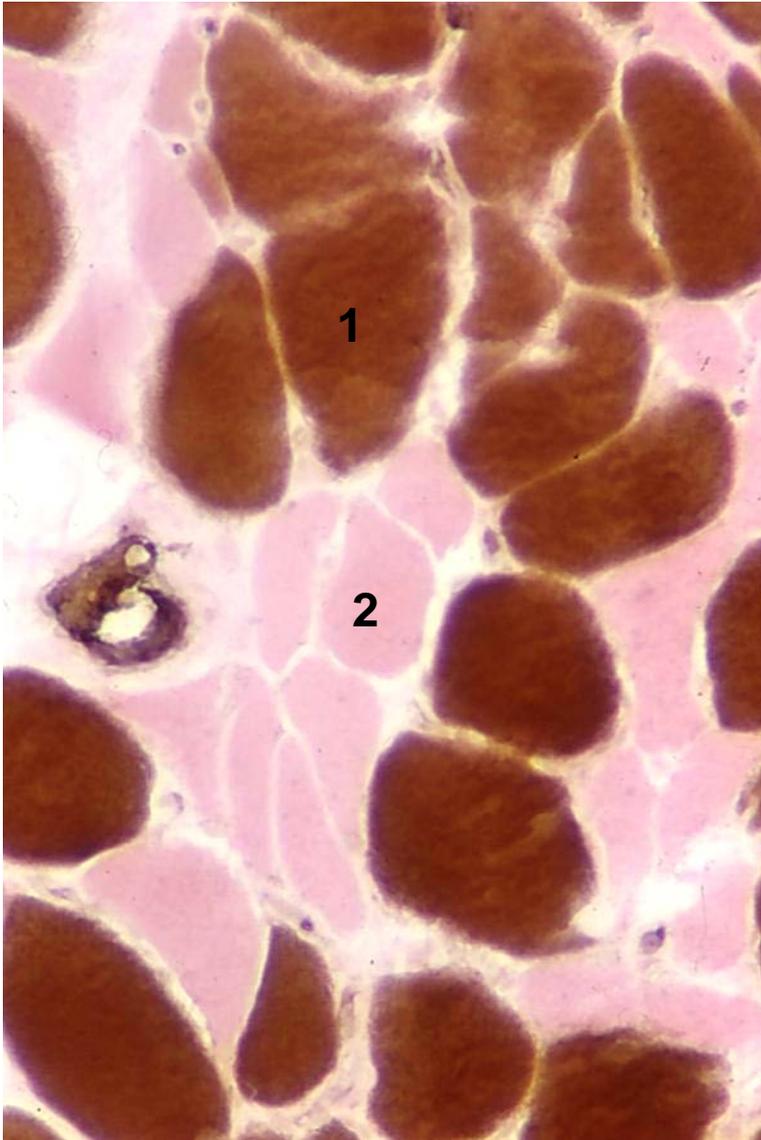


NADH-TR

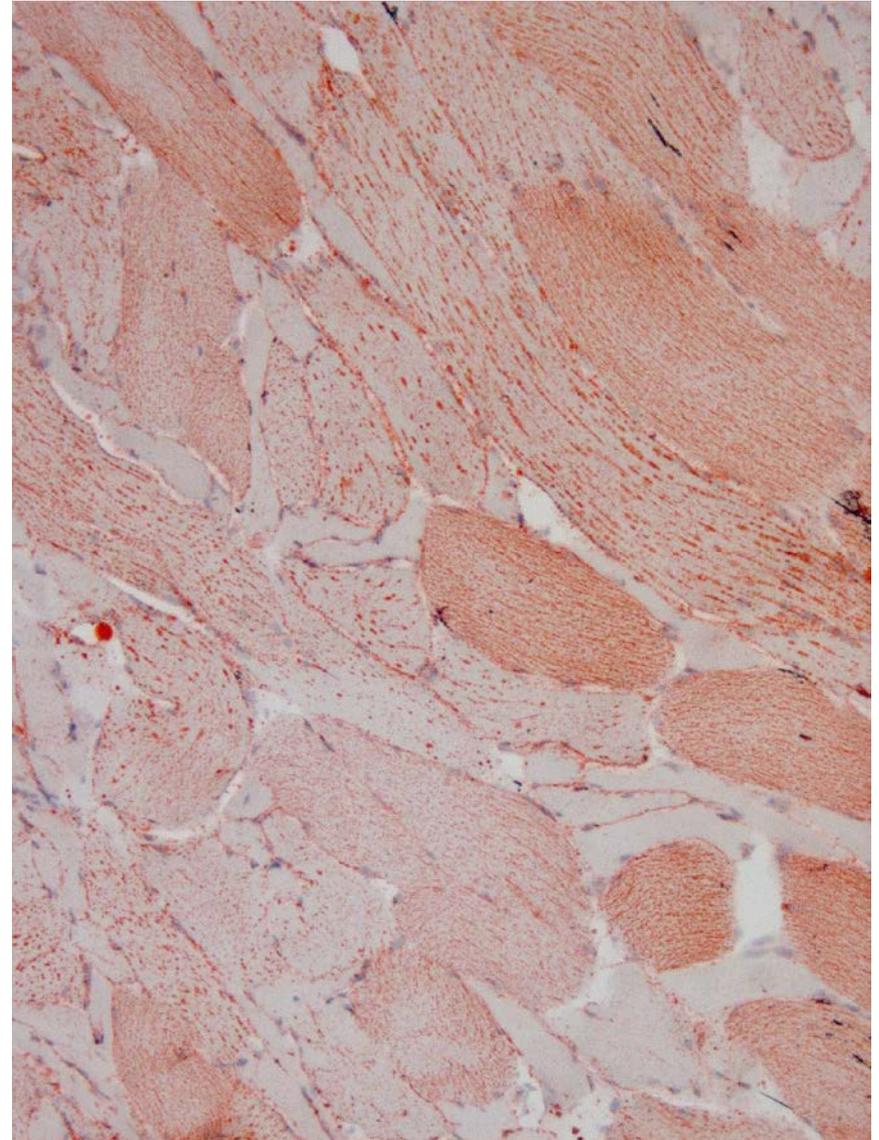


ATPasa pH 4,2

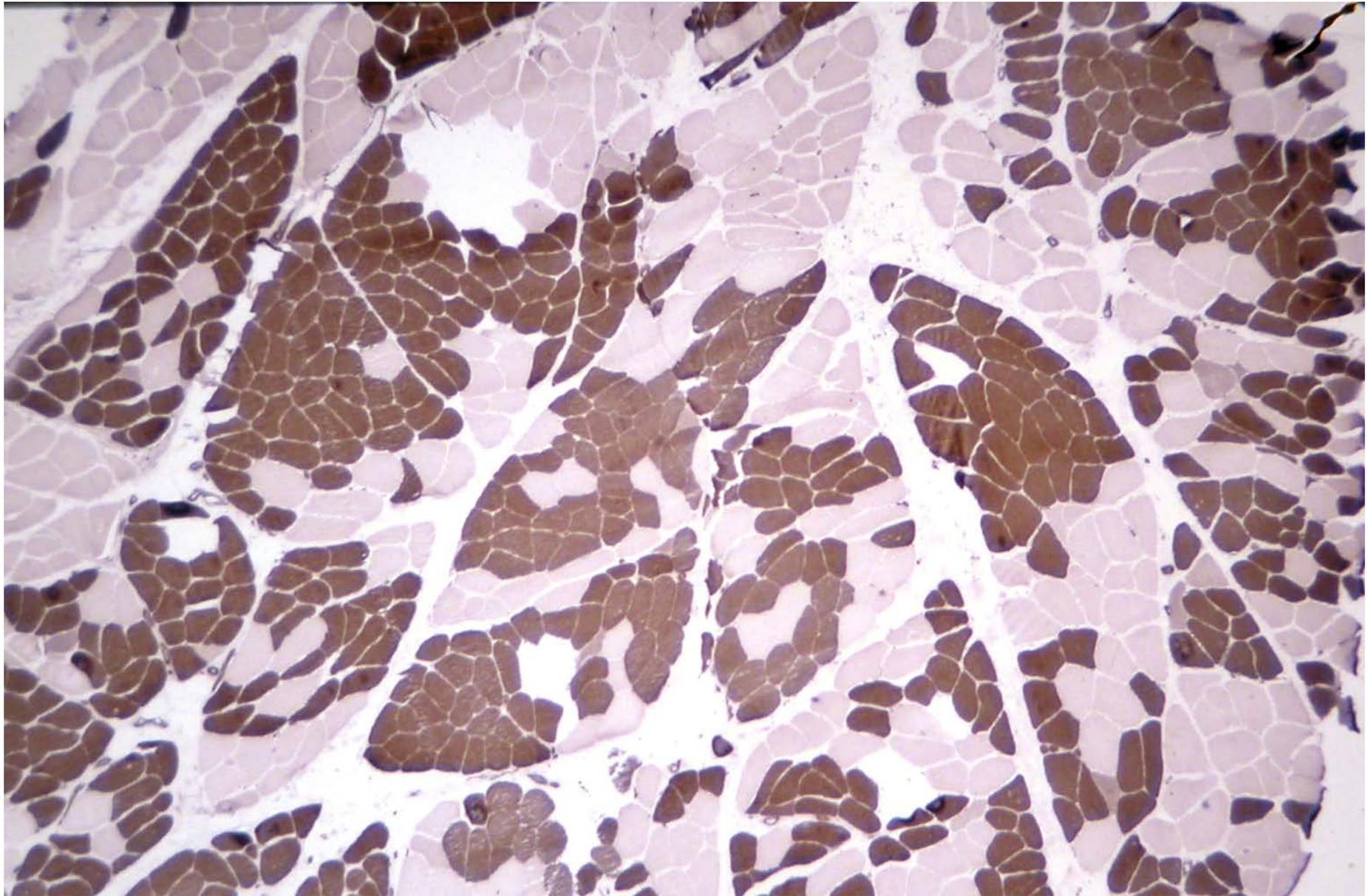
Miopatía esteroidea



Atrofia selectiva de fibras tipo 2
(ATPasa pH 4,2)



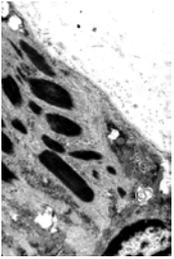
Oil-Red-O



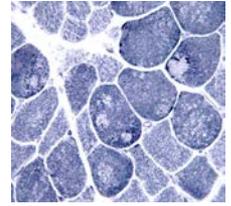
Agrupamiento de tipos de fibras

ATROFIA POR DENERVACIÓN

*En la actualidad la neurofisiología y los estudios genéticos son fundamentales para establecer el diagnóstico y son **excepcionales** los casos en los que se requiere biopsia muscular*

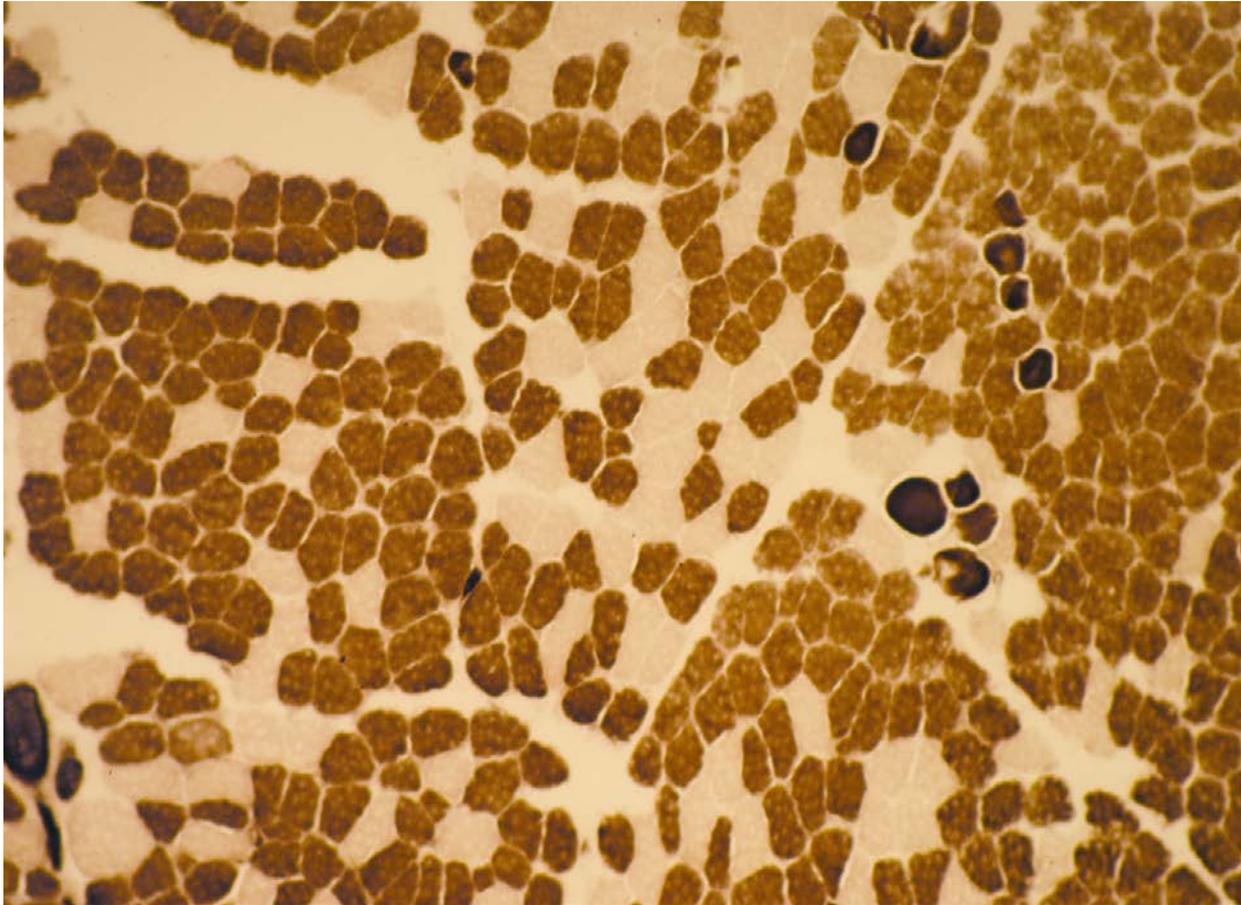


MIOPATÍAS CONGÉNITAS

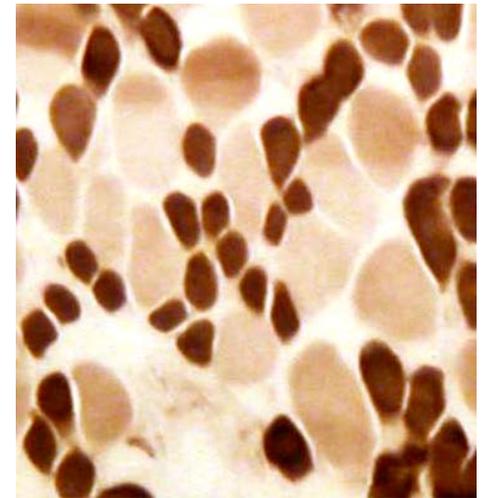


- *Grupo de enfermedades de origen genético **definidas en gran parte por los hallazgos anatomopatológicos en el músculo.***
- *Presentan marcada heterogeneidad clínica, histopatológica y genética dentro de cada entidad morfológica.*
- *La biopsia muscular es importante para el diagnóstico y de gran utilidad en la **orientación de la investigación genética.***
- *Gran relevancia de las **técnicas histoquímicas.***
- *Importancia de la **Microscopía Electrónica** (En algunas MC los defectos estructurales solo se demuestran en el estudio ultraestructural).*
- *Puede haber solapamiento de las características AP en distintas miopatías congénitas, por lo que es **esencial la correlación clínico-patológica.***

MIOPATÍAS CONGÉNITAS



***Predominio de fibras tipo 1
(ATPasa pH 4,2)***



***Atrofia de fibras tipo 1
(ATPasa pH 4,2)***

MIOPATÍAS CONGÉNITAS

Clasificación

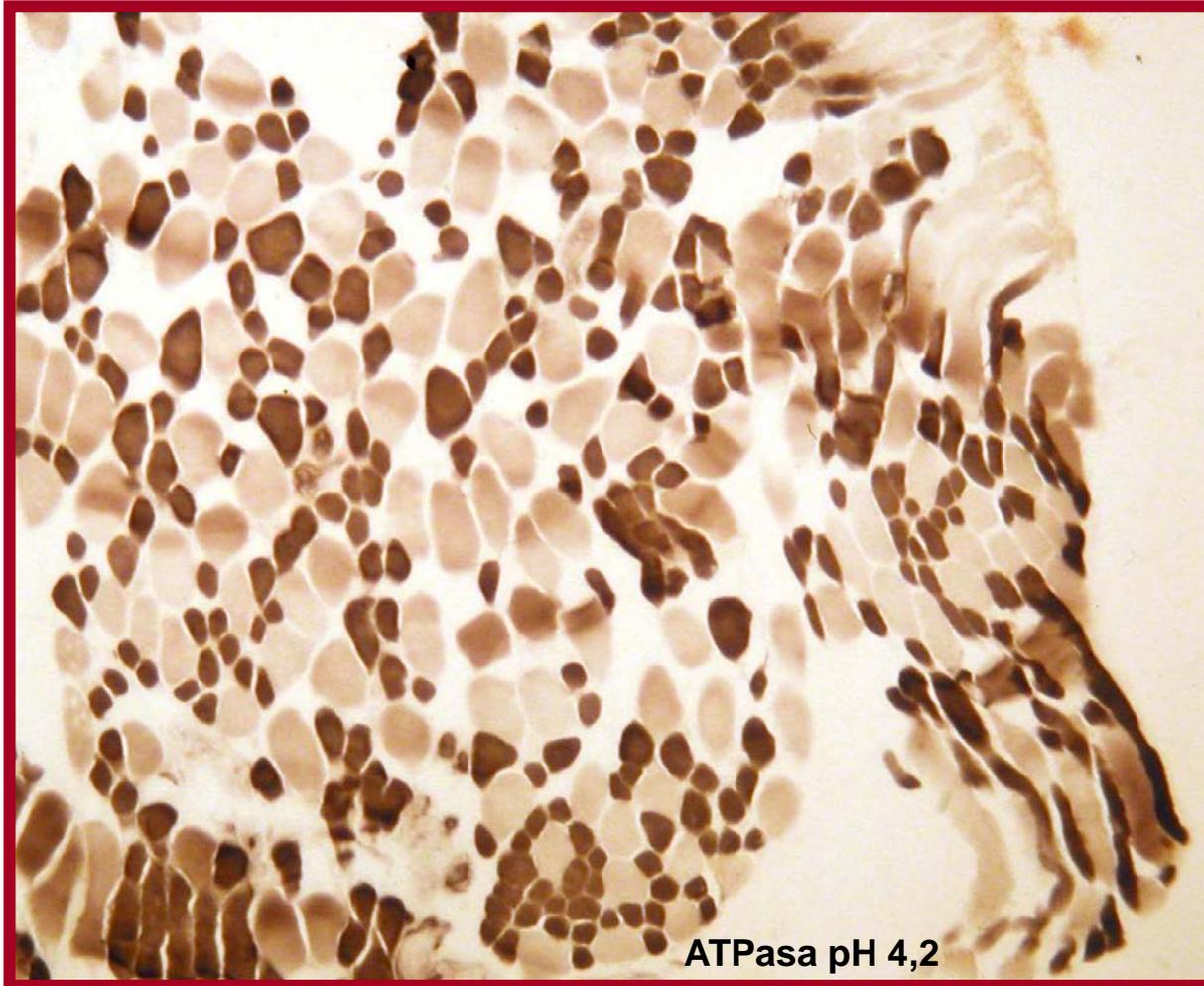
- ***MIOPATÍAS CON ALTERACIÓN EN LA MADURACIÓN***
 - *Miopatía miotubular ligada al cromosoma X*
 - *Desproporción congénita de tipos de fibras*

- ***MIOPATÍAS CON ANORMALIDADES NUCLEARES***
 - *Miopatías centronucleares*

- ***MIOPATÍAS CON ALTERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES Y CITOESQUELÉTICAS***
 - *Miopatías con cores:*
 - Con cores centrales*
 - Con multiminicores*
 - *Miopatía nemalínica*

Desproporción congénita de tipos de fibras

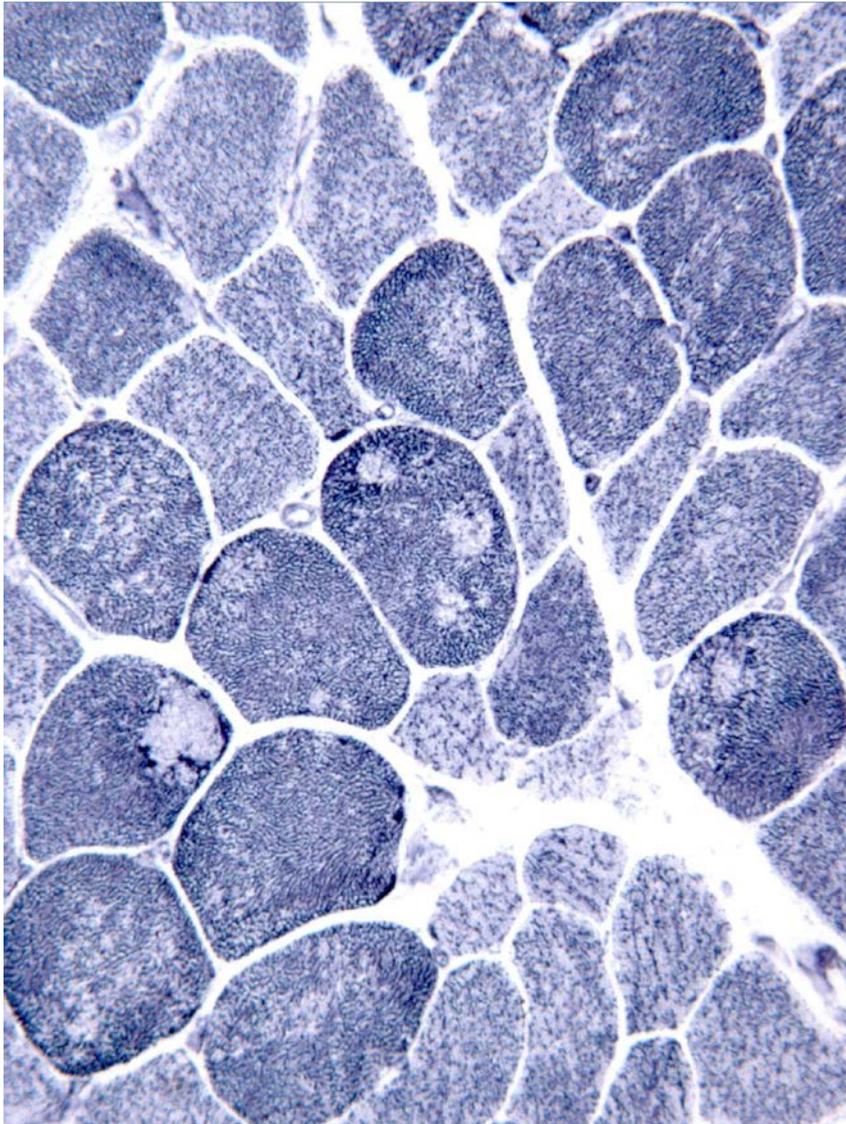
(Correlación clínico-patológica)



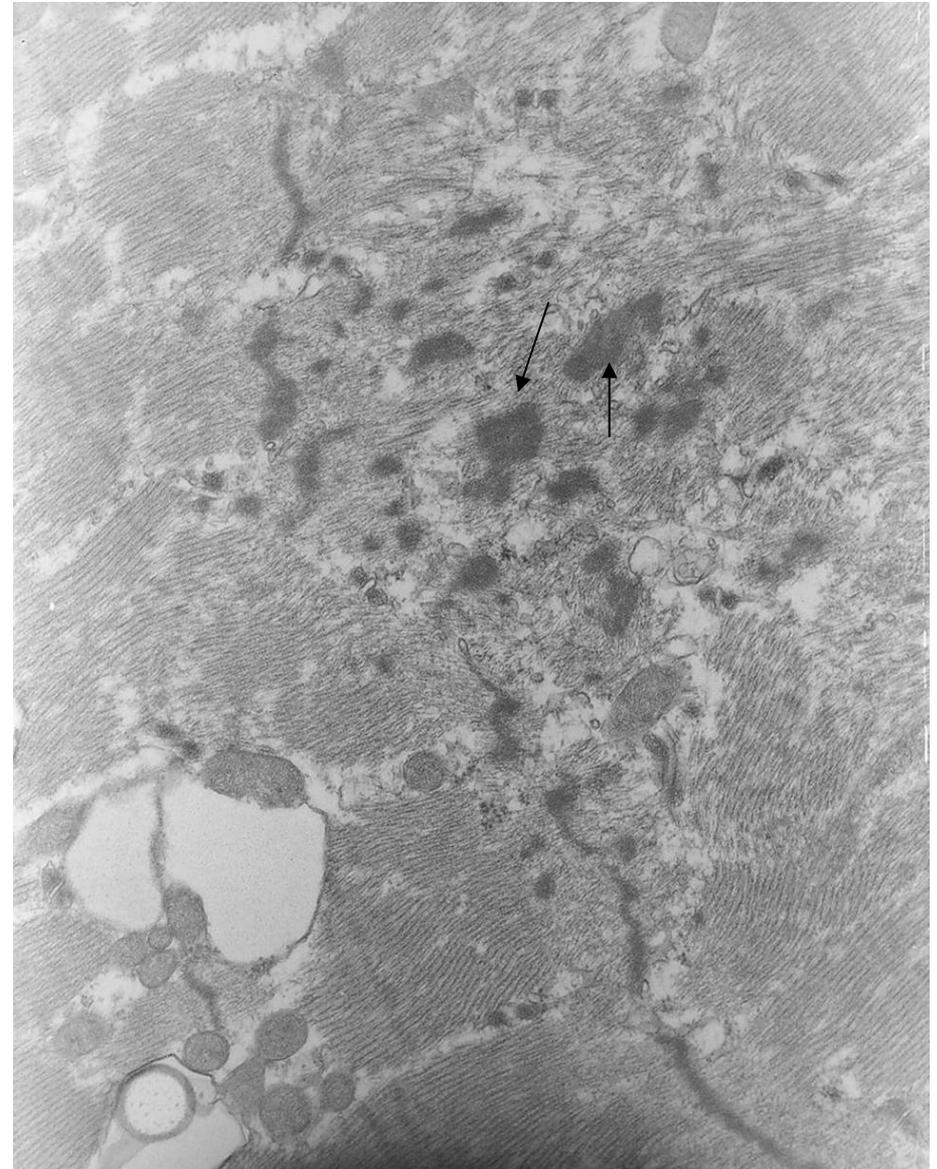
Atrofia selectiva de fibras tipo 1

Los diámetros medios de ambos tipos de fibras deben variar al menos en un 45%

Miopatías con cores

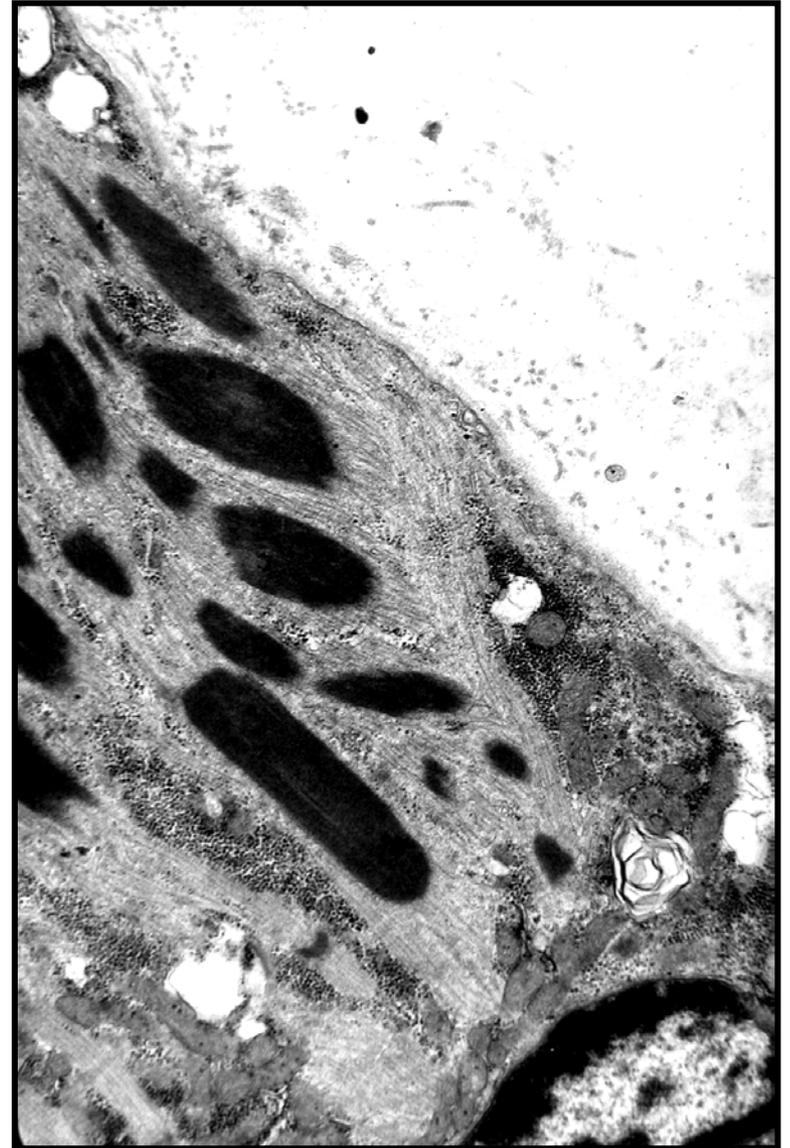
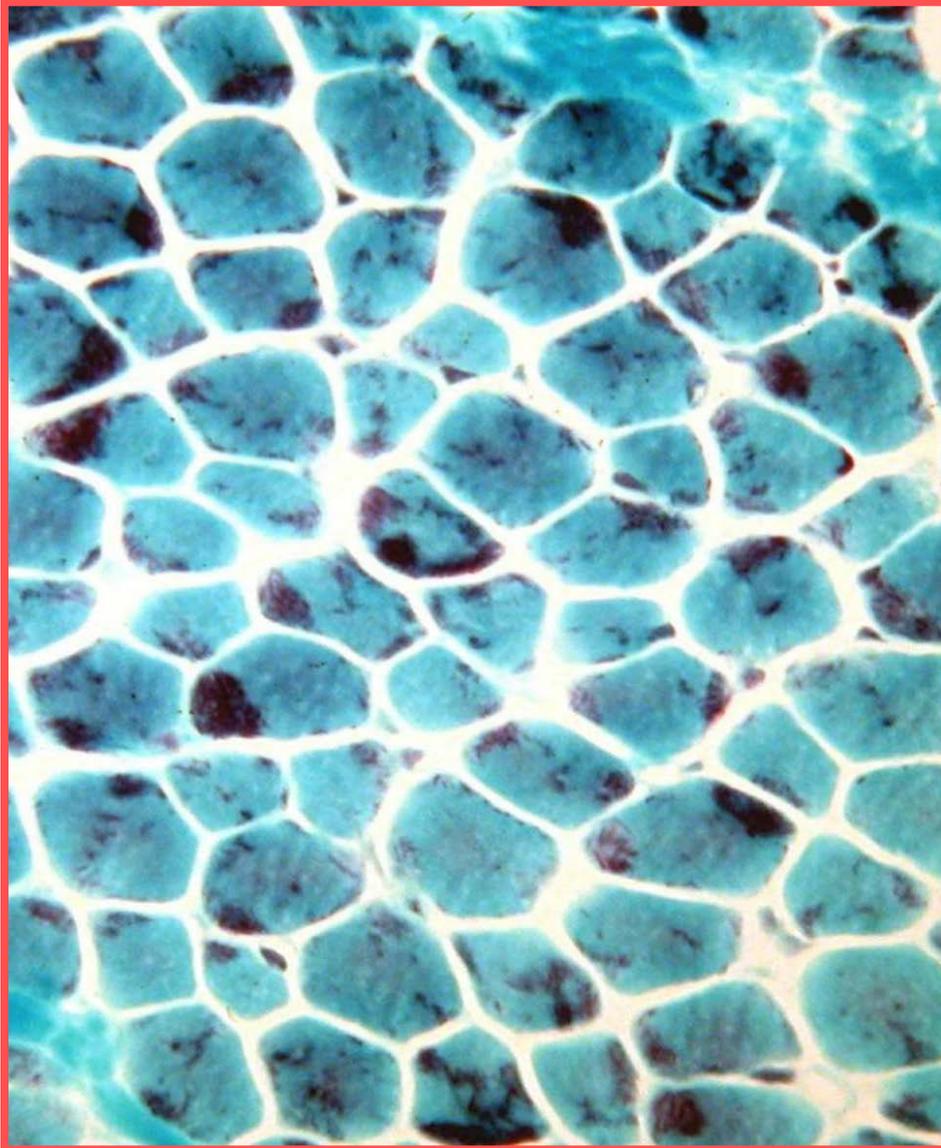


Multiminicores (NADH-TR)



*Imagen de ME cedida por el Dr. Gutierrez Molina.
Servicio AP HU La Paz-Madrid*

Miopatía nemalínica



Tricrómico modificado de Gomori

MIOPATÍAS METABÓLICAS

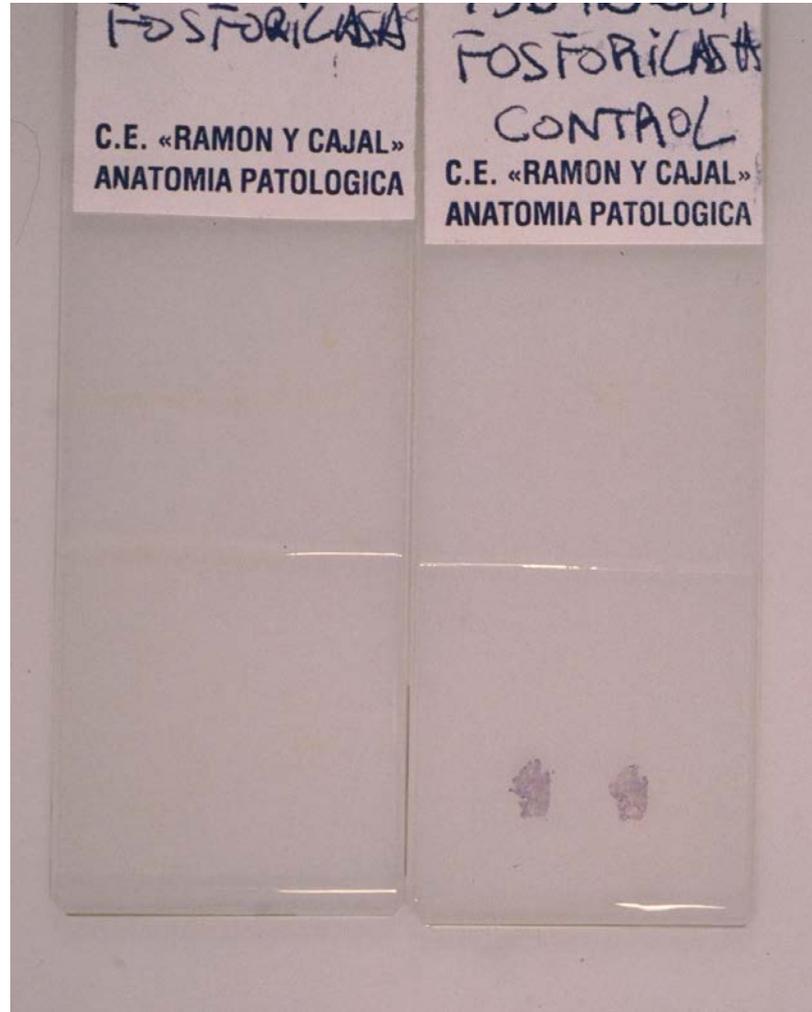
- ***Glucogenosis***
- ***Miopatías mitocondriales***
- ***Miopatías lipídicas***

GLUCOGENOSIS QUE AFECTAN AL MÚSCULO

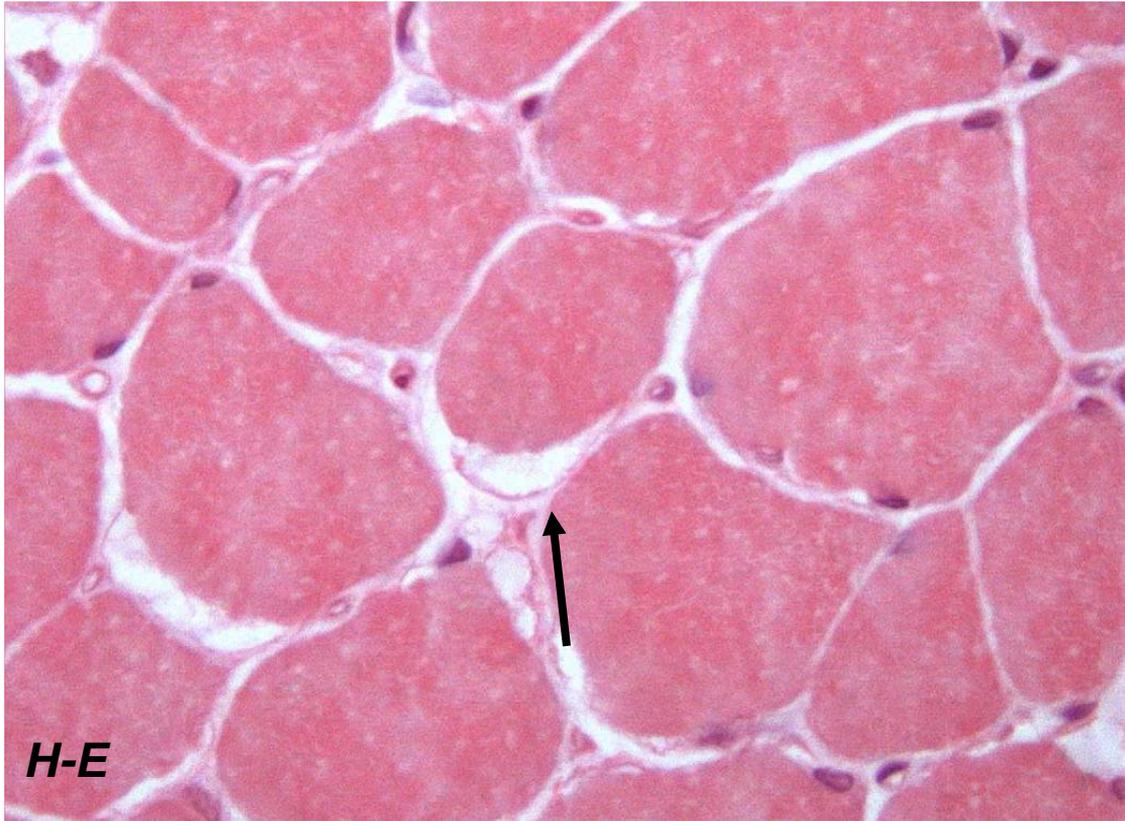
Tipos II, III, IV, V, VII y otros tipos menos frecuentes

- *En la actualidad ha disminuido el nº de biopsias musculares para el diagnóstico de esta patología, debido a su diagnóstico mediante métodos bioquímicos o genéticos.*
- *El 75% de pacientes con enfermedad de McArdle se puede diagnosticar en el estudio genético en sangre (Rubio JC et al. Hum Mutat 28:203-4, 2007).*
- *La determinación del déficit enzimático en biopsia muscular es útil si la enfermedad no se demuestra por otros métodos*
- *En las **glucogenosis tipo V** (McArdle, déficit de fosforilasa) y **tipo VII** (Tauri, déficit de fosfofructoquinasa), la ausencia de la actividad enzimática se puede demostrar con **técnicas histoquímicas en el músculo.***

GLUCOGENOSIS TIPO V (Enfermedad de Mc. Ardle)



Fosforilasa



H-E

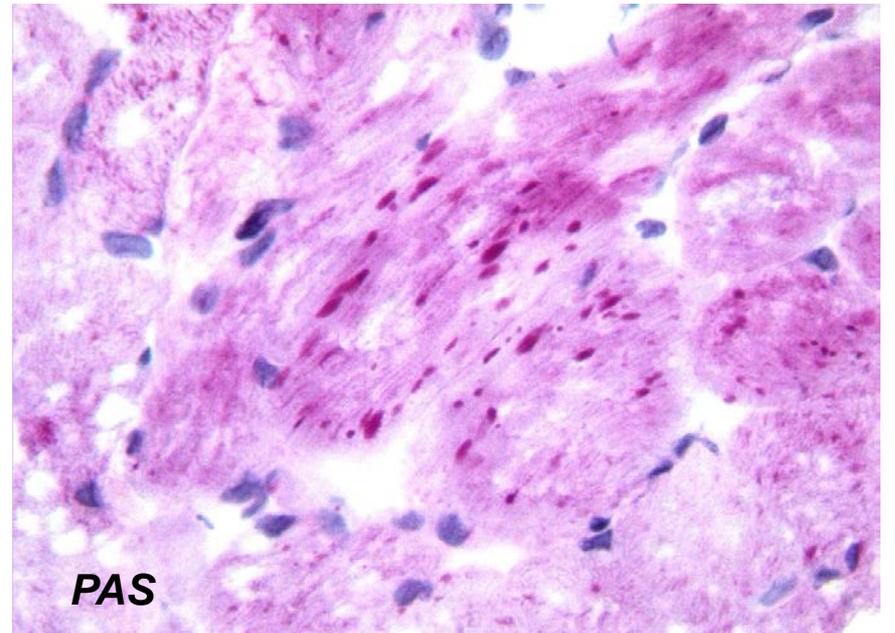
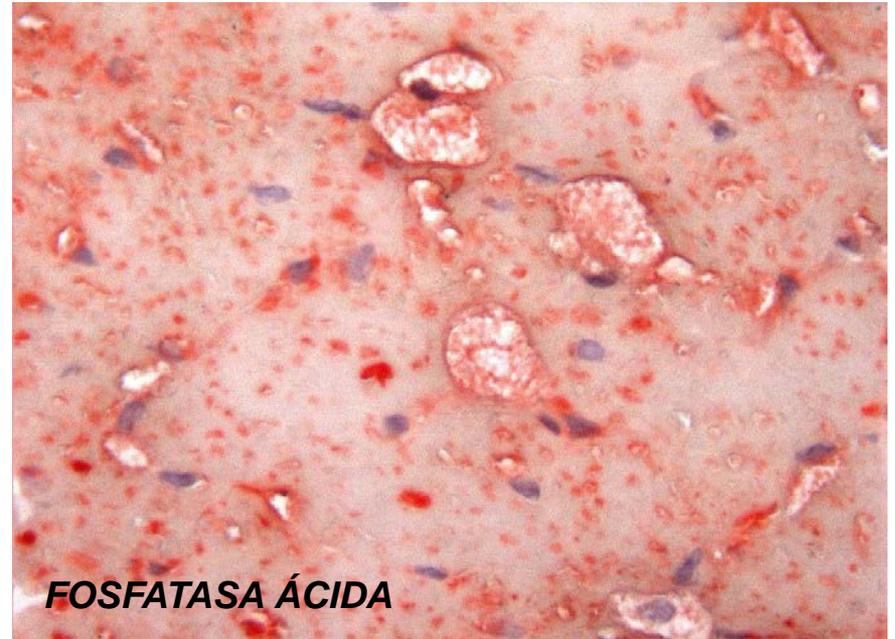
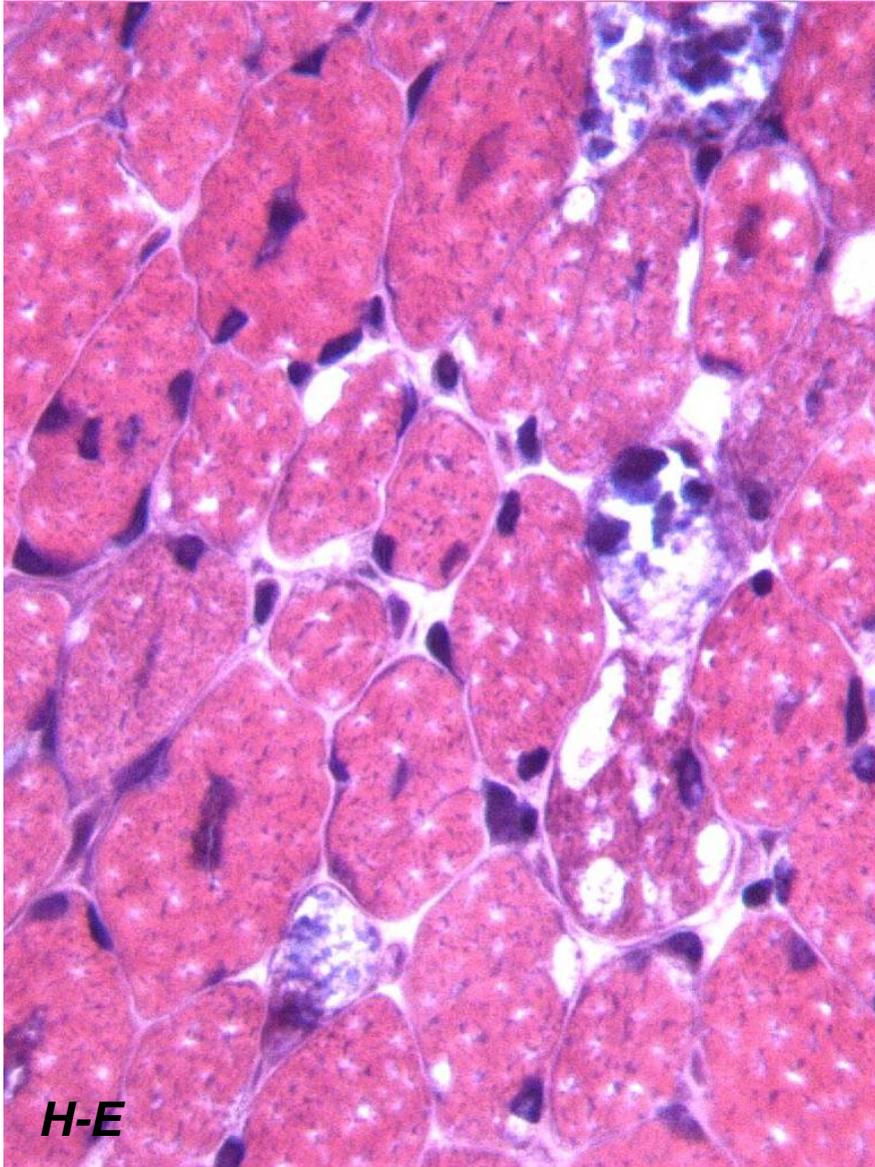


PAS

GLUCOGENOSIS TIPO V

(Enfermedad de Mc. Ardle)

ENFERMEDAD DE POMPE (GLUCOGENOSIS TIPO II)

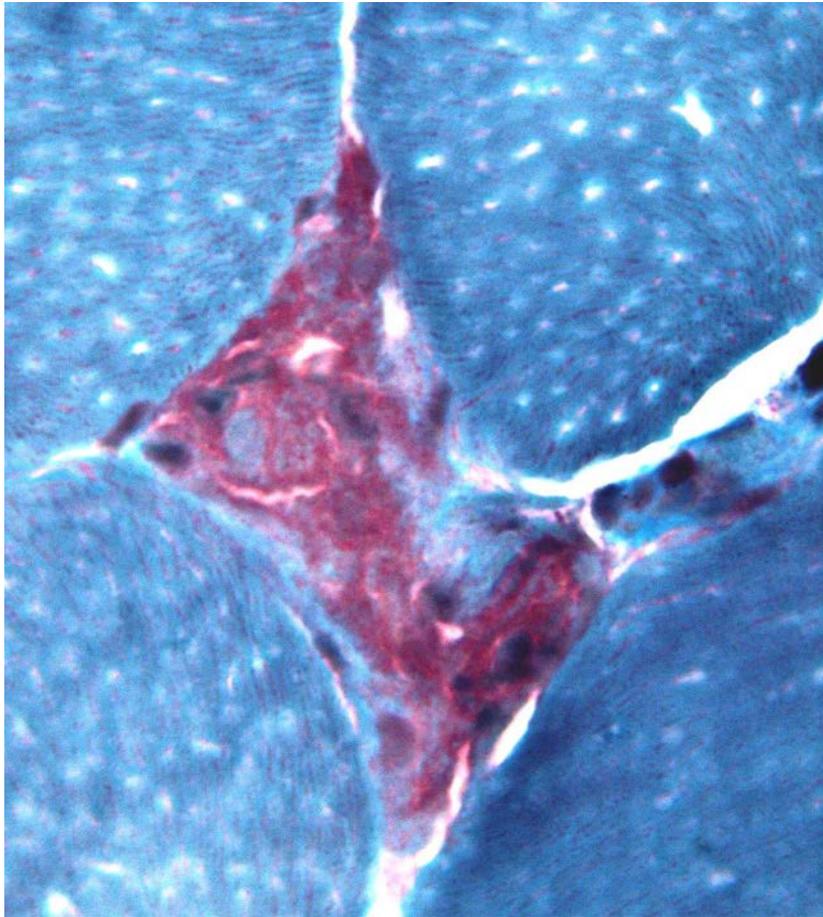


MIOPATÍAS MITOCONDRIALES

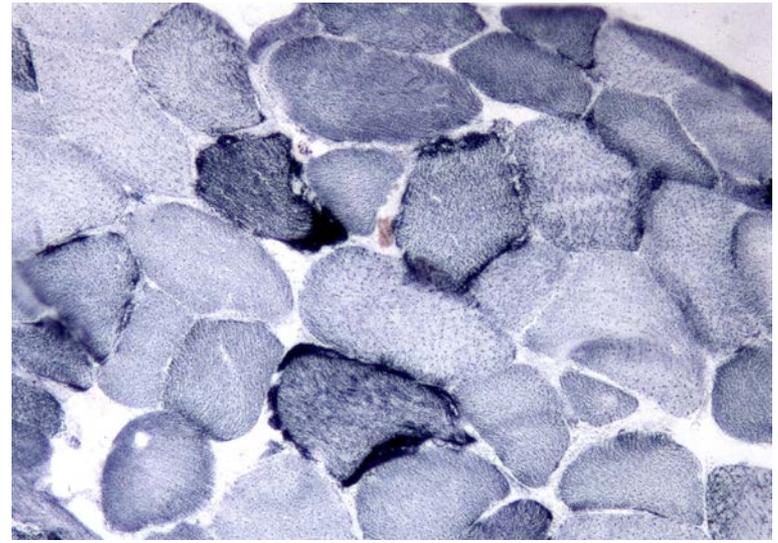
- *Para su diagnóstico son necesarios datos:*
 - Clínicos
 - Histológicos
 - Bioquímicos (cadena respiratoria)
 - Genéticos
- *La biopsia muscular es el **tejido de elección** en casos de sospecha de miopatía mitocondrial, ya que el sarcoplasma contiene gran cantidad de mitocondrias que producen la energía necesaria para la síntesis de ATP.*

MIOPATÍAS MITOCONDRIALES

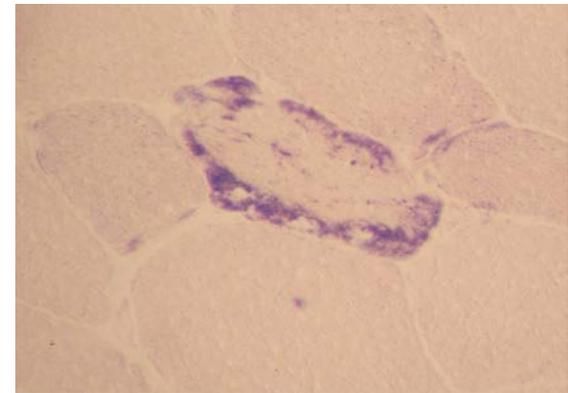
Fibras rojo-rasgadas



Tricrómico modificado de Gomori

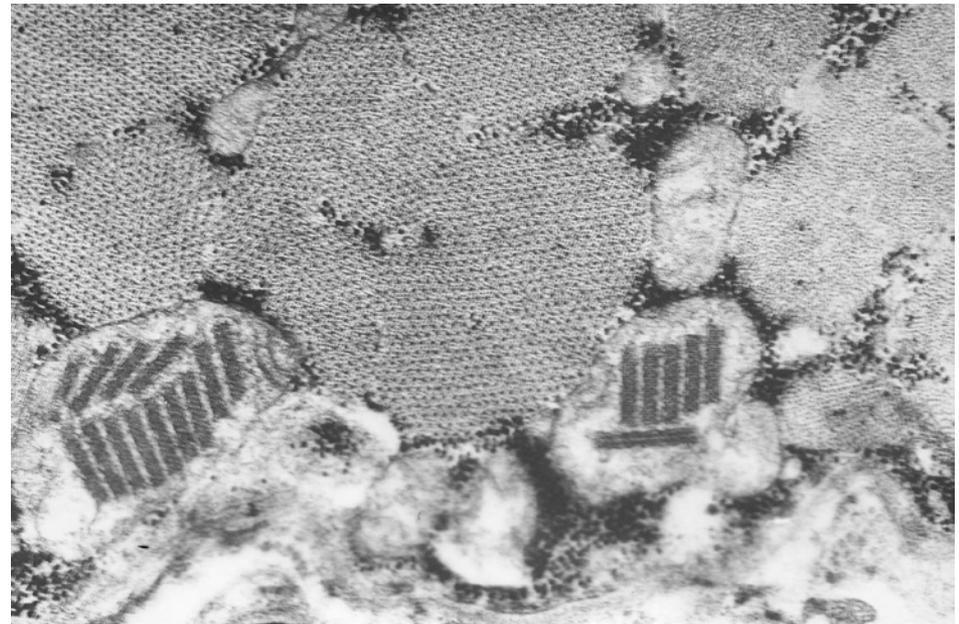
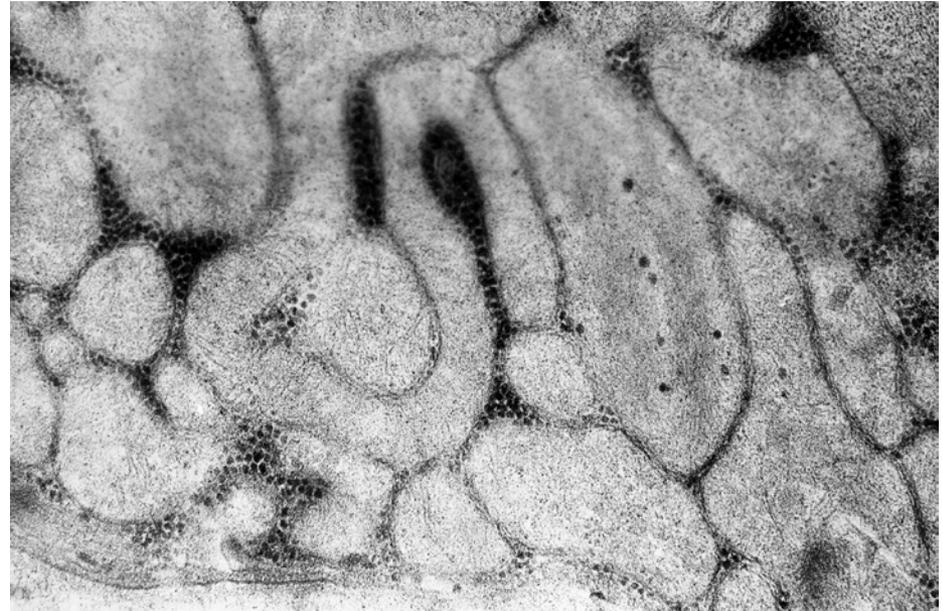
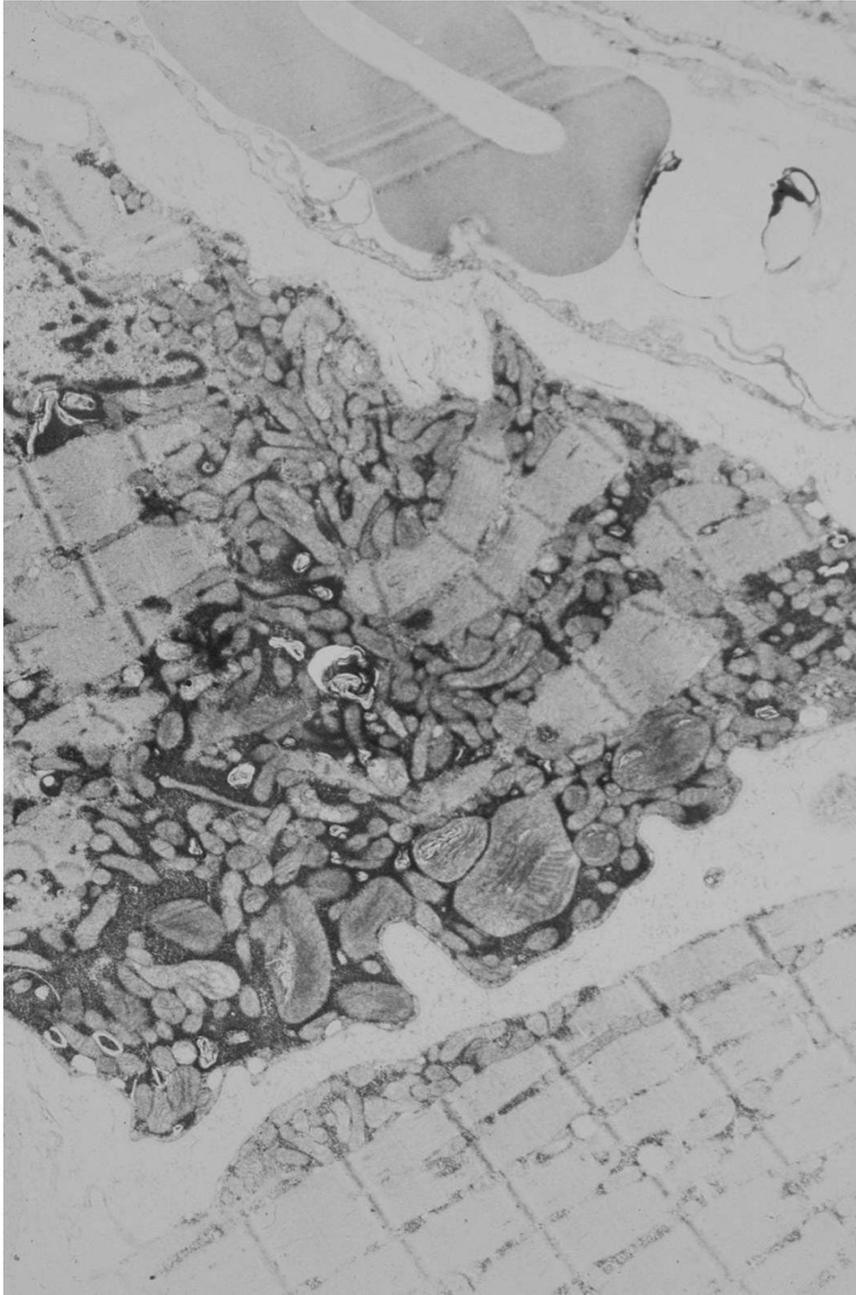


NADH-TR



SDH

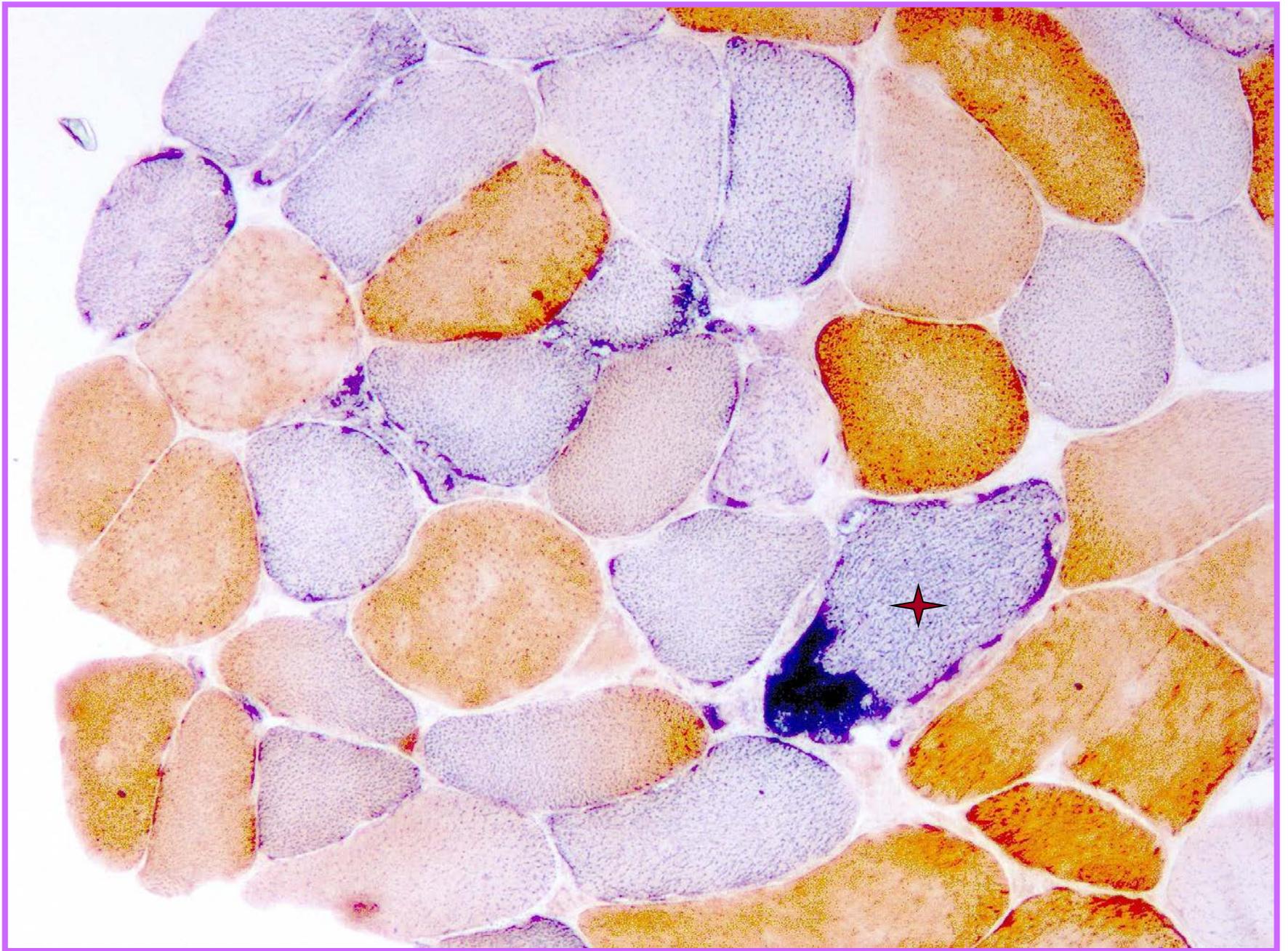
Miopatía mitocondrial



MIOPATÍAS MITOCONDRIALES

Fibras rojo-rasgadas

- *Características de las miopatías mitocondriales, aunque no son patognomónicas.*
- *Pueden verse en diversas situaciones: Distrofias musculares, miopatías inflamatorias e, incluso, en personas de edad.*
- *No suelen observarse en:*
 - Niños menores de 3 años
 - Atrofia óptica de Leber
 - Síndrome de Leigh



COX-SDH (Fibras COX negativas) (MERRF)

MIOPATÍAS MITOCONDRIALES

Valoración de la actividad COX

- **Fibras COX negativas**

- Fibras rojo-rasgadas COX negativas:**

- Epilepsia mioclónica con FRR (**MERRF**) (mutaciones puntuales del ARNt)
 - Síndrome de Kearns-Sayre (**KSS**) (Deleciones del ADNmt)
 - Oftalmoplegia externa progresiva cronica (**CPEO**) (Deleciones del ADNmt)

- Fibras COX negativas sin características de fibras rojo-rasgadas**
(Sugieren que el defecto enzimático precede a la proliferación mitocondrial).

- Pueden encontrarse fibras COX negativas en miopatías inflamatorias y en personas de edad**

- **Fibras COX positivas**

- Fibras rojo-rasgadas COX positivas:**

- Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de tipo ictus (**MELAS**)
(mutaciones puntuales del ARNt)
 - Mutaciones de genes estructurales mitocondriales

- **Disminución difusa de actividad COX en la deficiencia de COX infantil**



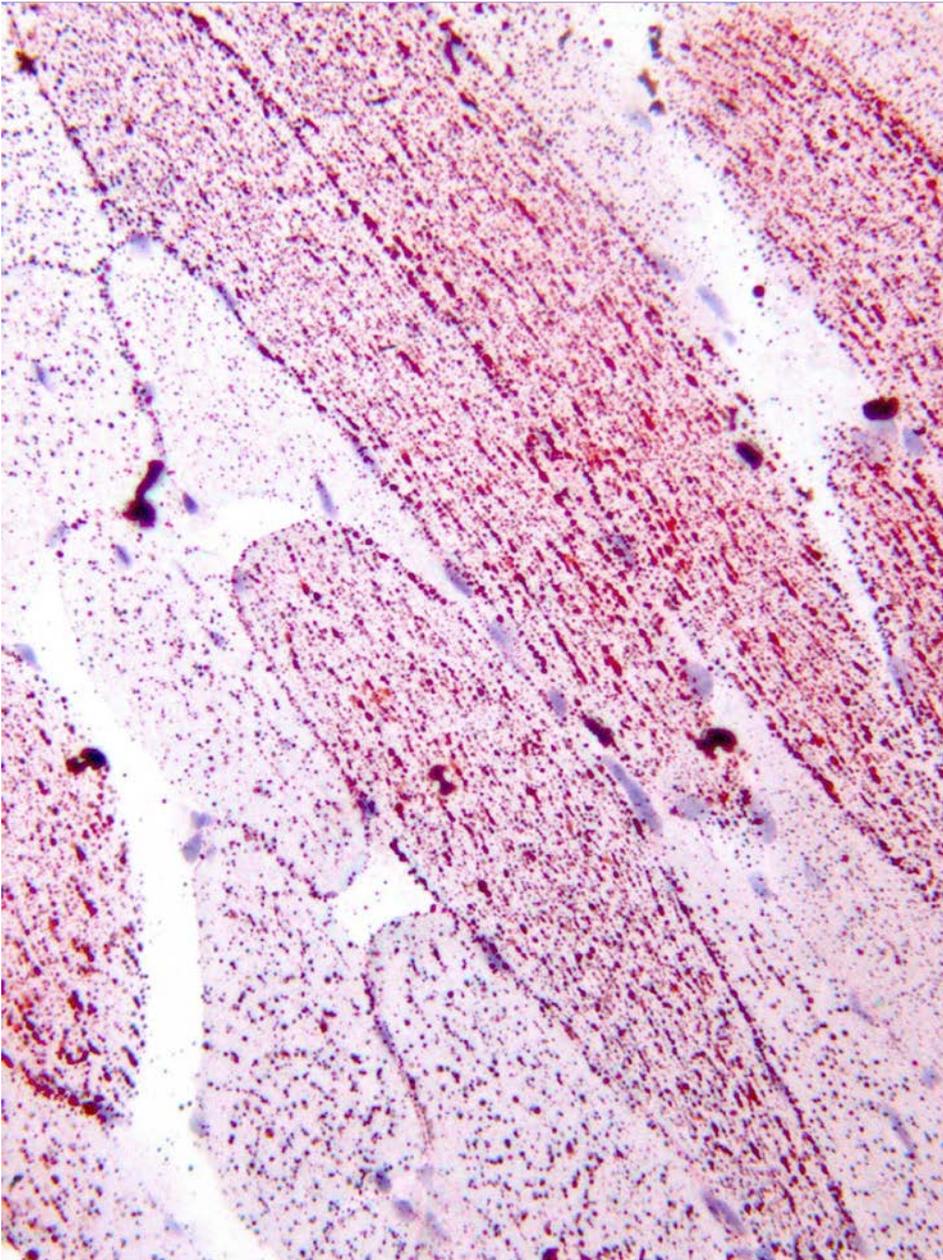
???

MIOPATÍAS MITOCONDRIALES

Si hay sospecha clínica de Miopatía Mitocondrial:

- *La ausencia de fibras rojo-rasgadas o de fibras COX negativas en la biopsia muscular no descarta patología mitocondrial.*
- *Debe continuarse el estudio en el tejido muscular congelado (Cadena respiratoria; estudio genético)*

MIOPATÍAS LIPÍDICAS



Oil-Red-O

Déficit primario de carnitina

-Gran cantidad de lípidos sobre todo en las fibras tipo 1

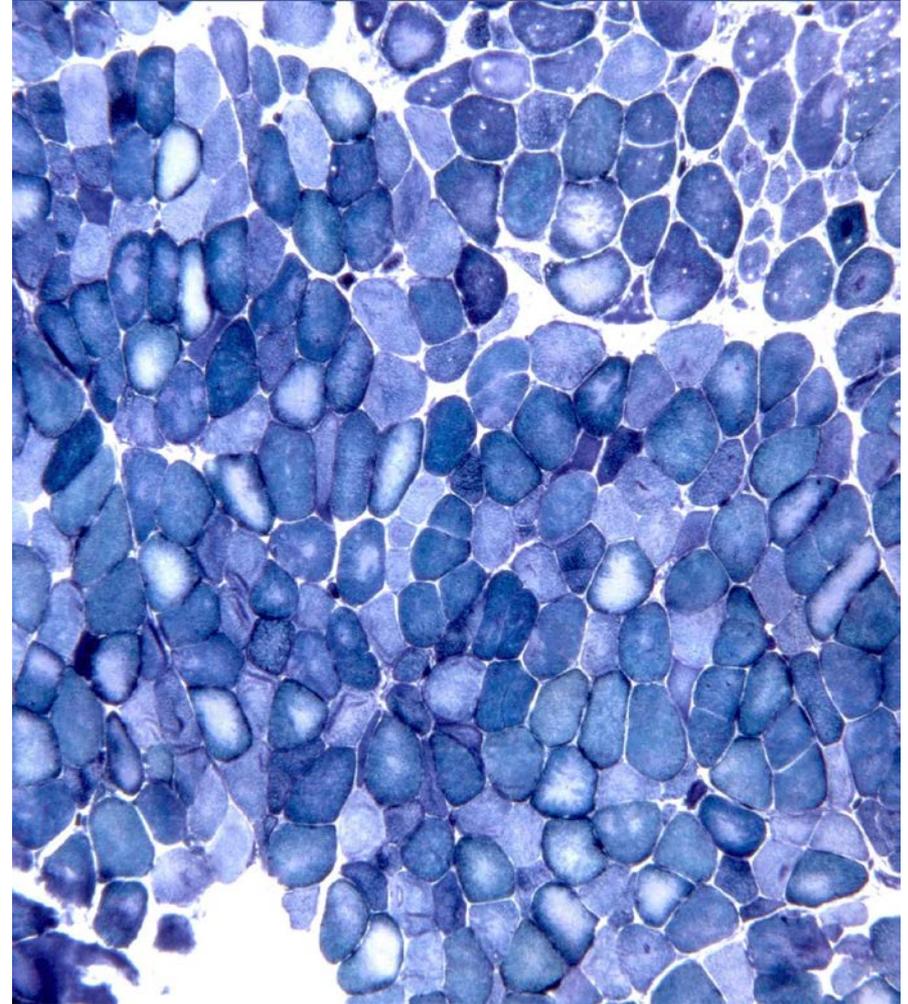
-El diagnóstico de certeza se realiza con la determinación de carnitina en el músculo

Déficit de Carnitina Parmitoil Transferasa

- *Las alteraciones de la biopsia muscular son poco relevantes e inespecíficas y entre los ataques puede ser normal en alrededor de dos tercios de los casos.*
- *El diagnóstico se realiza con la **determinación enzimática de CPT** en músculo, fibroblastos, leucocitos o por genética molecular.*

MIOPATÍA HIPOTIROIDEA

- *Cambios miopáticos inespecíficos en la biopsia muscular*
- *Alteraciones con técnicas oxidativas*



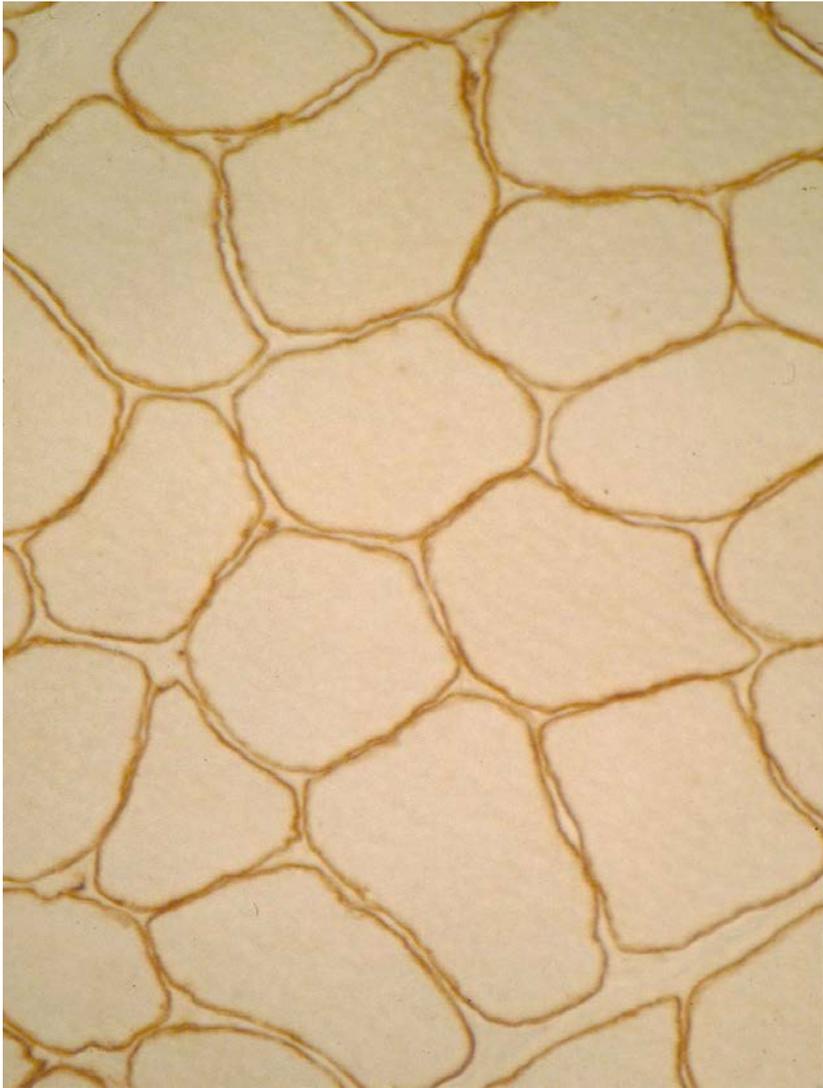
DPNH-TR

TÉCNICAS

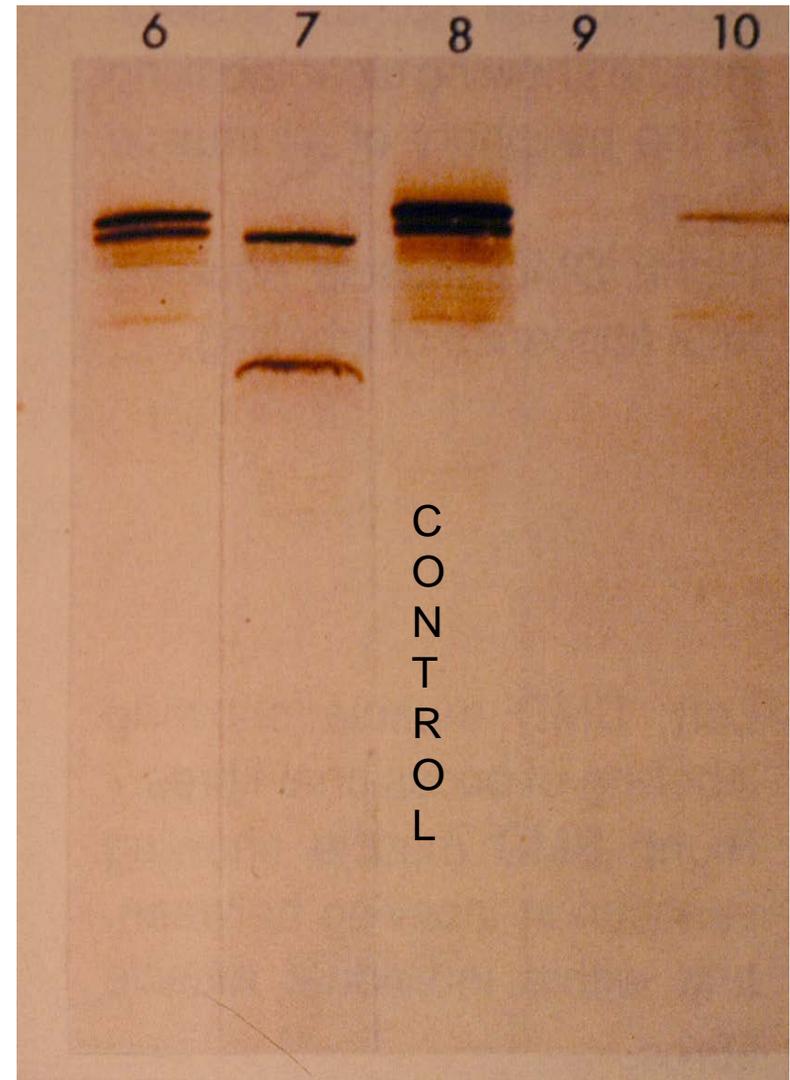
INMUNOHISTOQUÍMICAS

WESTERN-BLOT

TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS



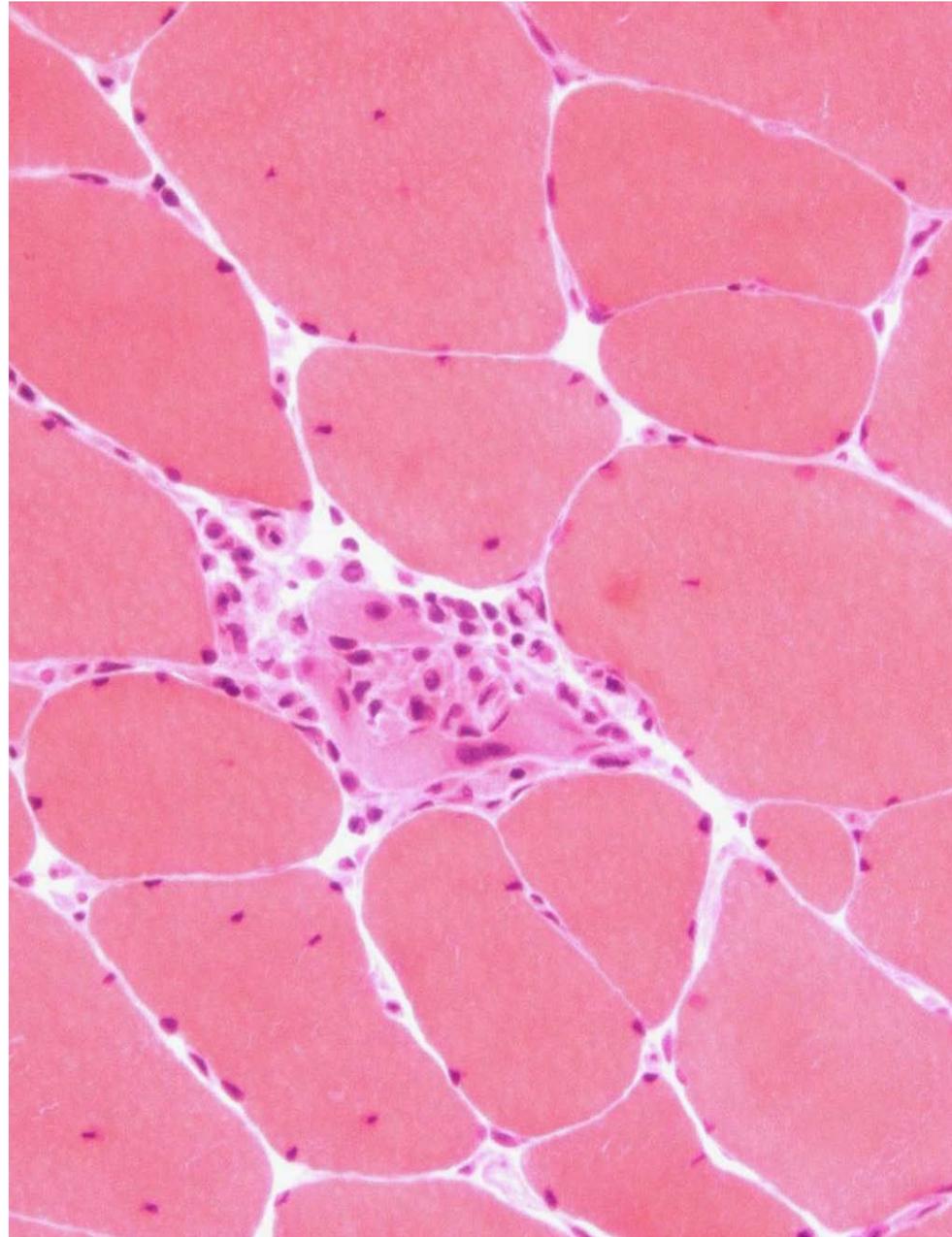
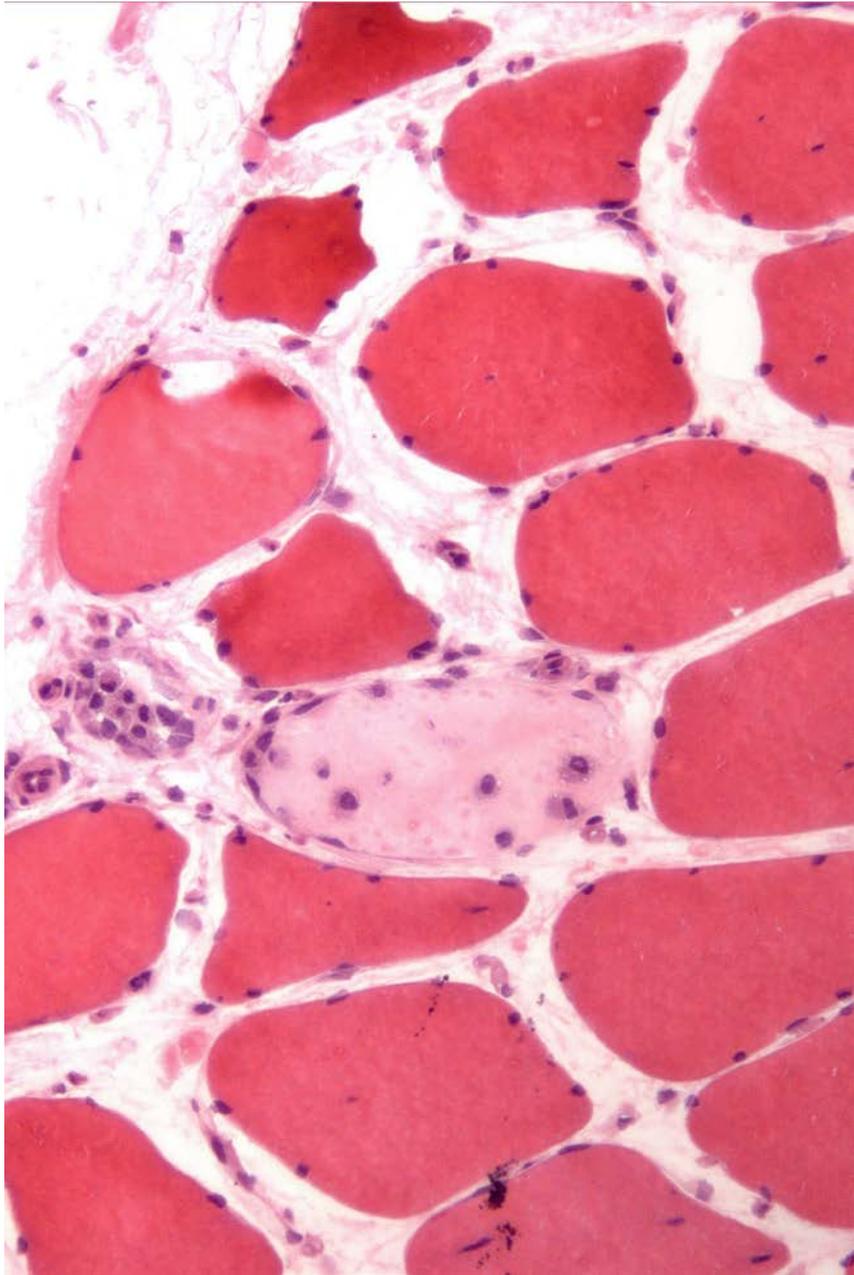
Western blot



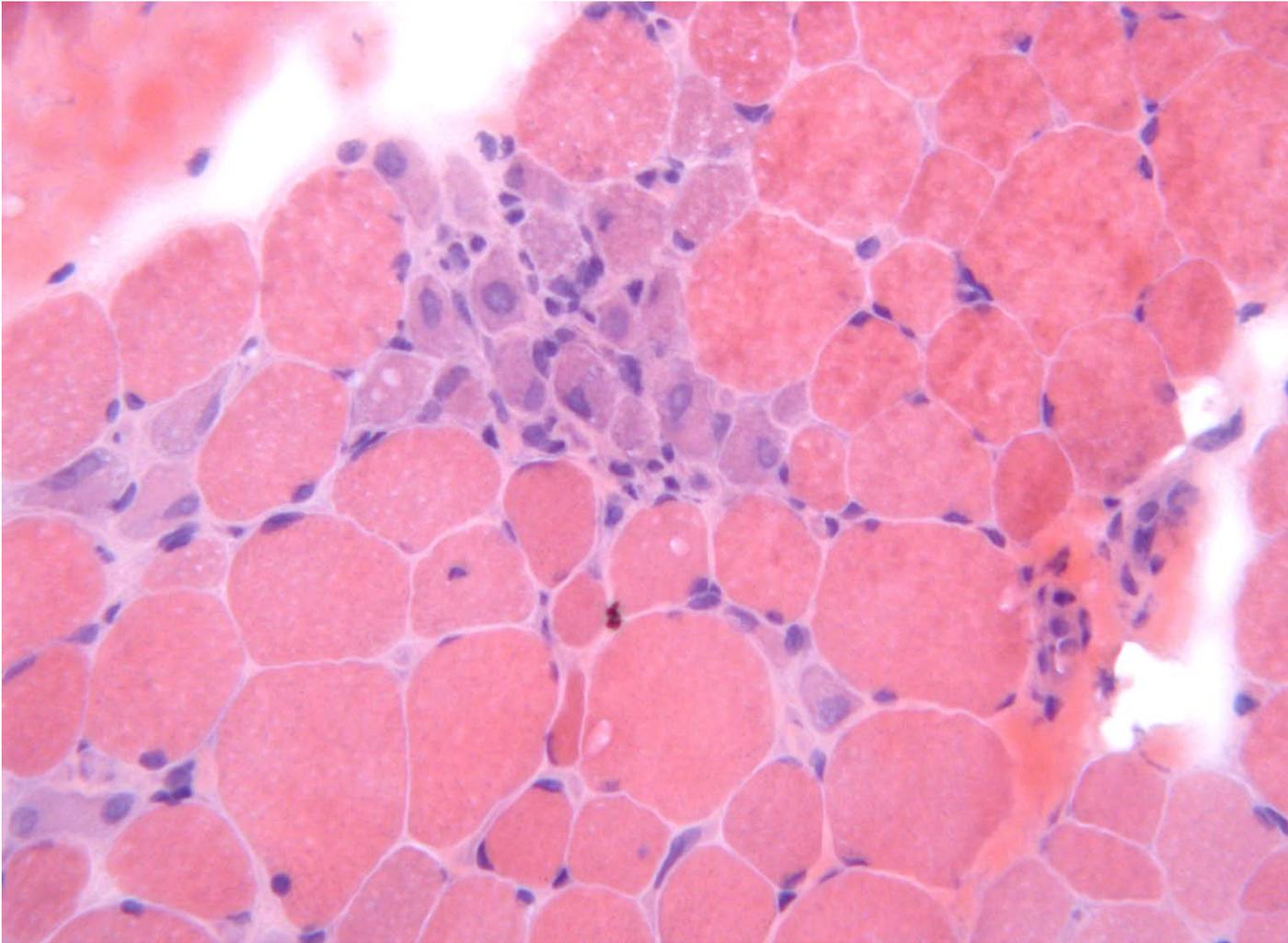
Gran utilidad en distrofias musculares

DISTROFIAS MUSCULARES

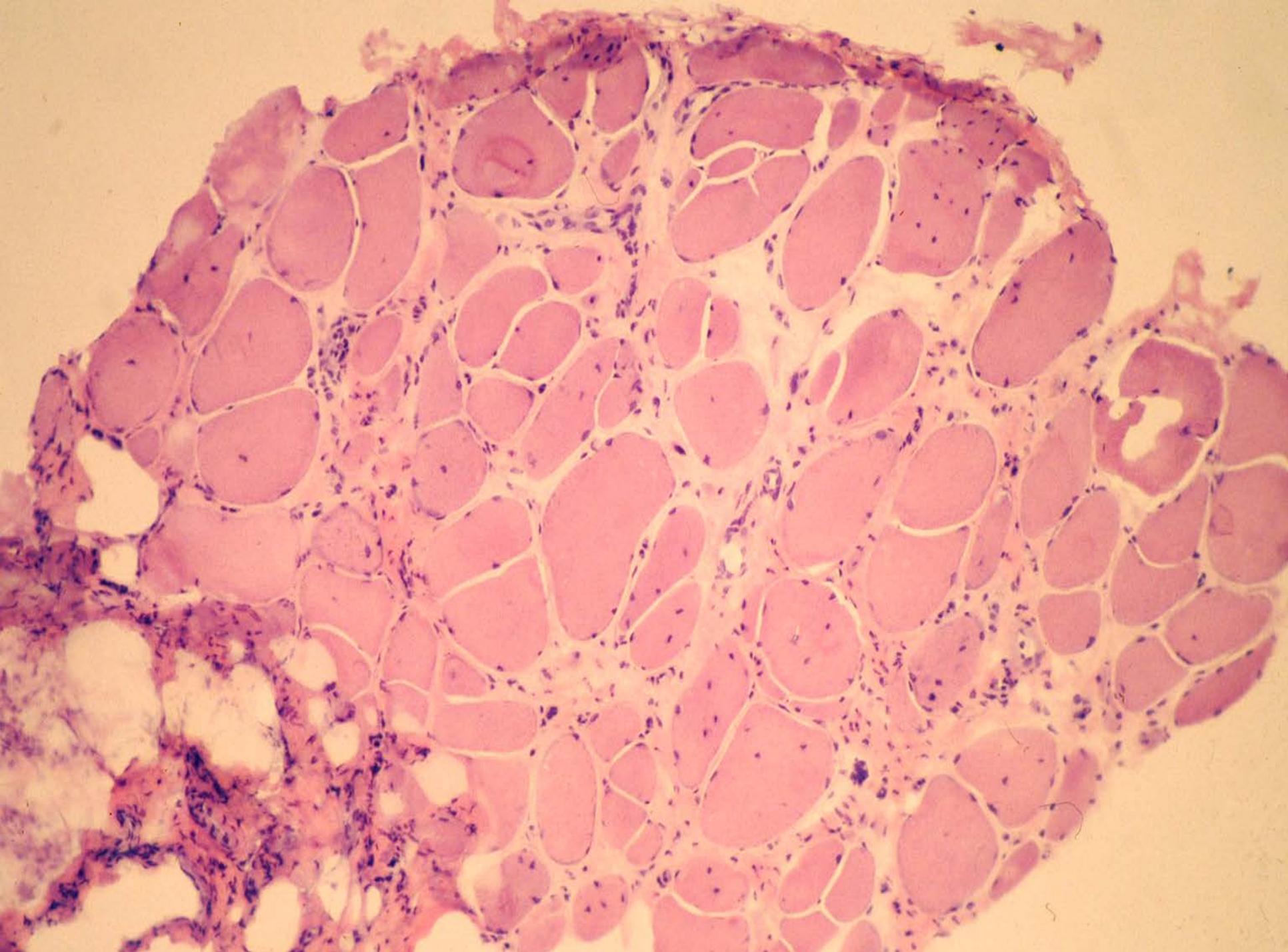
- *Grupo de enfermedades musculares primarias hereditarias caracterizadas por degeneración y regeneración muscular (miopatías necrotizantes), elevación de CPK sérica y debilidad muscular*
- ***Biopsia muscular***
 - *Alteraciones miopáticas (**inespecíficas**) de grado variable con técnicas estándar*
 - *Gran importancia de las técnicas **IHQ**, que permiten diagnósticos específicos o bien orientar al clínico para la realización de otros estudios complementarios.*
 - *En determinados casos es necesaria para el diagnóstico la técnica de **W-B***
- *Confirmación diagnóstica mediante estudios genéticos*

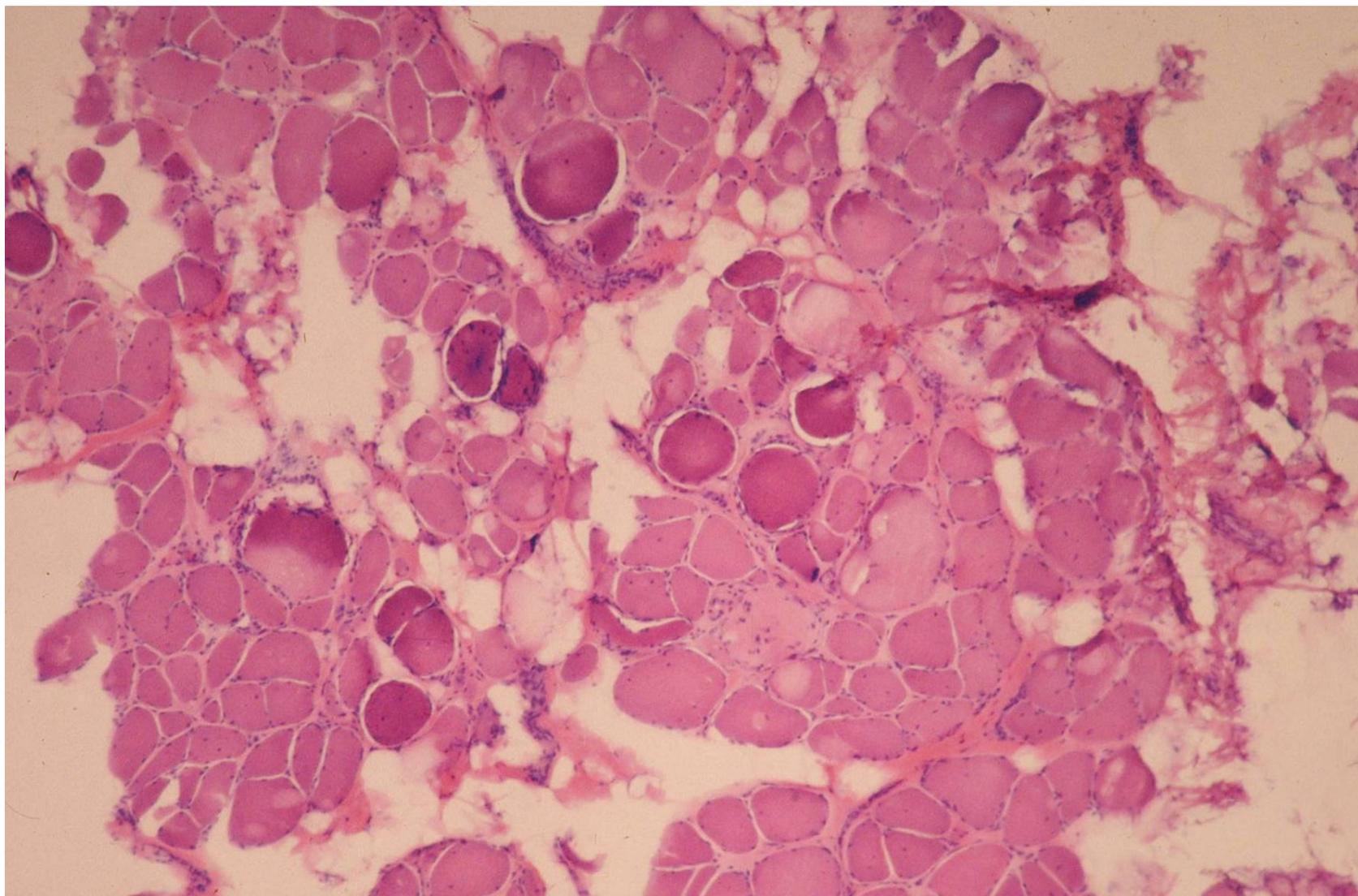


Fibras necróticas

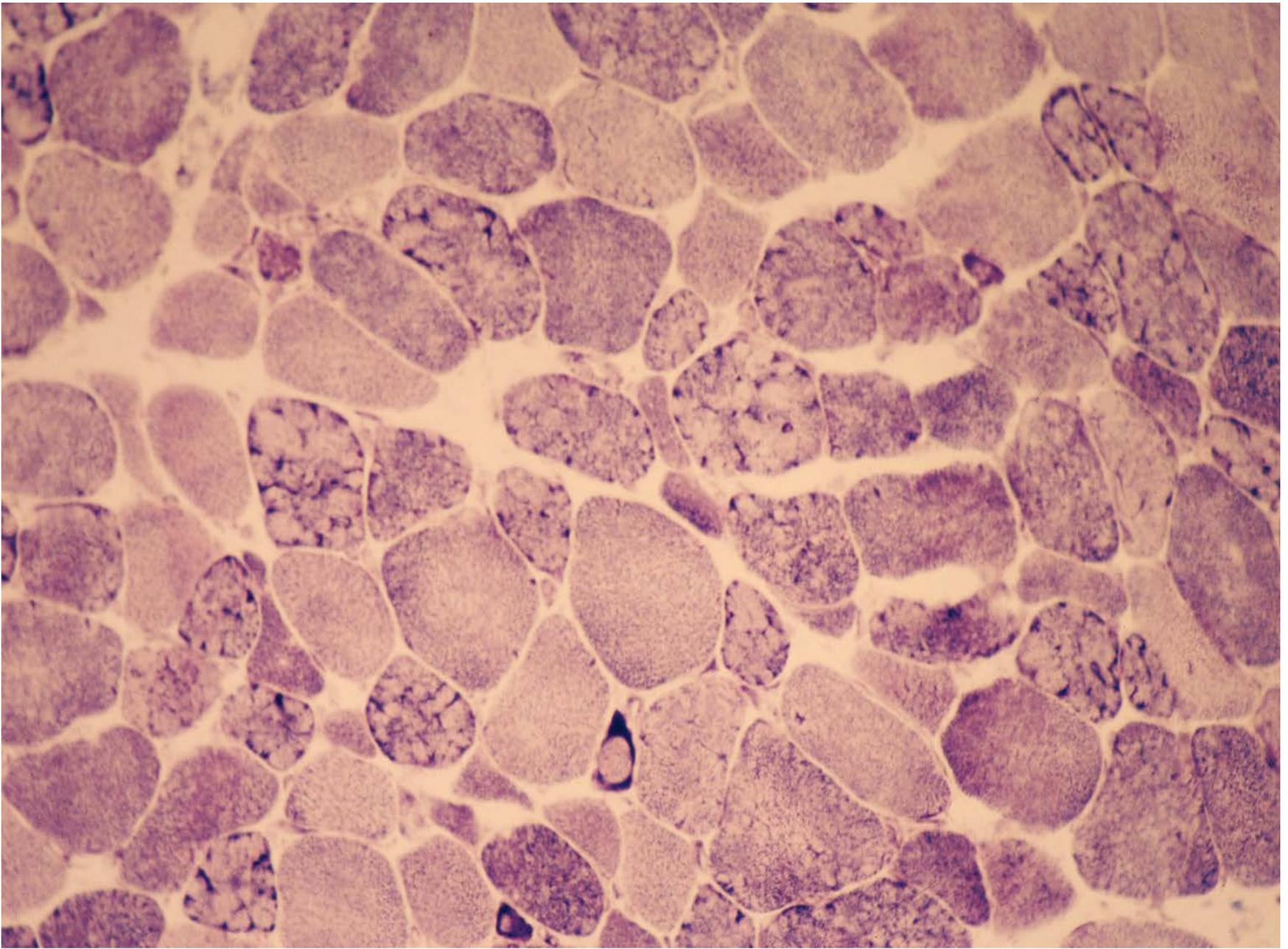


Fibras basófilas



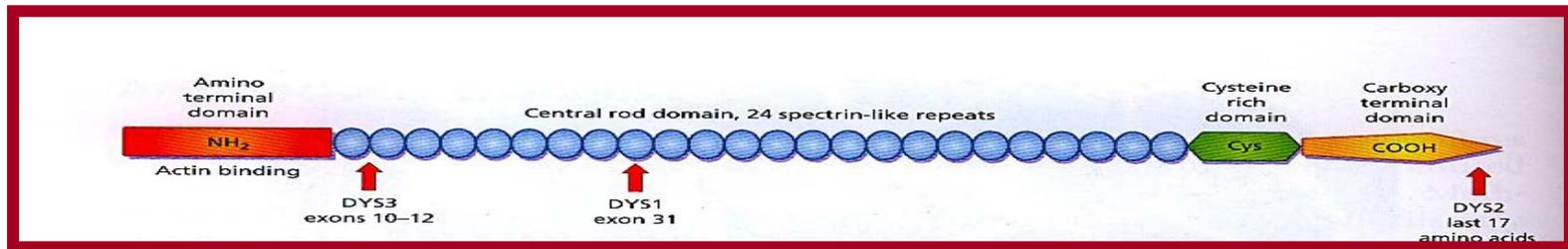


Fibras redondeadas hialinas frecuentes en la distrofia muscular de Duchenne



Fibras lobuladas. Frecuentes en calpainopatías (DPNH-TR)

GEN DE LA DISTROFINA



- *Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene in normal and affected individuals. Cell 1987; 50:509-517*
- *Hoffman EP, Brown RH Jr., Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 1987; 51: 919-928*

Limb–Girdle and Congenital Muscular Dystrophies: Current Diagnostics, Management, and Emerging Technologies

Carolina Tesi Rocha · Eric P. Hoffman

Published online: 14 May 2010

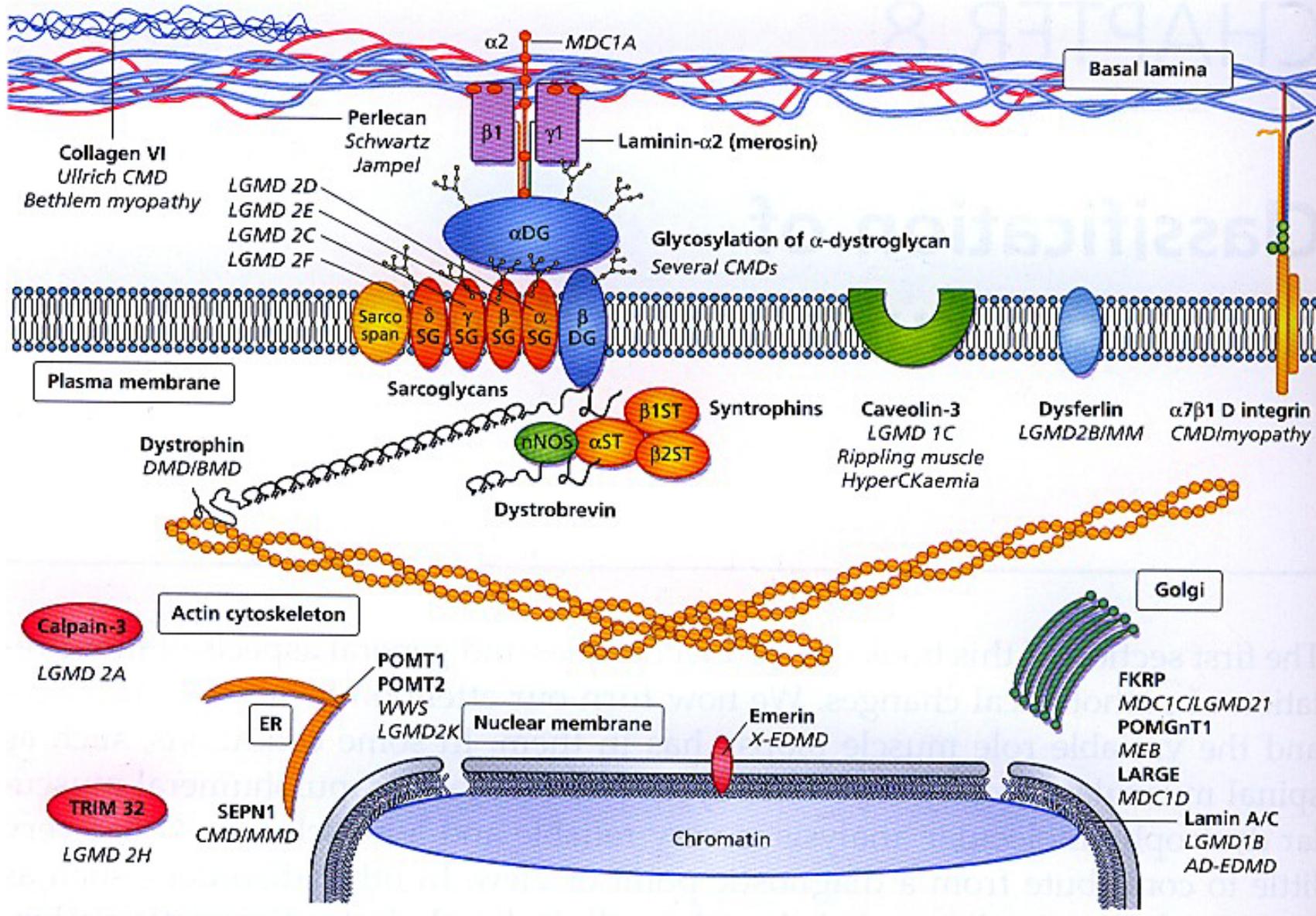
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract The muscular dystrophies show muscle degeneration and regeneration (necrotizing myopathy) on muscle biopsy, typically associated with elevated serum creatine kinase, and muscle weakness. In 1986, the first causative gene was identified for the most prevalent and best-characterized form of muscular dystrophy, Duchenne muscular dystrophy. Over the past 25 years, the number of other genes determined to cause different subtypes has grown rapidly. This review gives a synopsis of the 45 genetically defined types of muscular dystrophies and describes the clinical, pathologic, and molecular aspects of each disease. DNA diagnosis remains the most sensitive and specific method for differential diagnosis, but molecular diagnostics can be expensive and complex (because of multiple genes at multiple testing facilities) and reimbursement may be challenging to obtain. **Keywords** Limb-girdle muscular dystrophy · Congenital muscular dystrophies · Diagnosis · Treatment · Muscular dystrophies · Hypotonia · Weakness · Calf hypertrophy · Joint contractures · Creatine kinase · Calpain deficiency · Dysferlinopathies · Sarcoglycanopathies · Fukutin-related protein · Telethonin · Titin · Emery Dreifuss · Myotilin · Caveolin · Muscle glycosylation disorders · POMT · LARGE · Merosin · Collagen VI

Keywords Limb-girdle muscular dystrophy · Congenital muscular dystrophies · Diagnosis · Treatment · Muscular dystrophies · Hypotonia · Weakness · Calf hypertrophy · Joint contractures · Creatine kinase · Calpain deficiency · Dysferlinopathies · Sarcoglycanopathies · Fukutin-related protein · Telethonin · Titin · Emery Dreifuss · Myotilin · Caveolin · Muscle glycosylation disorders · POMT · LARGE · Merosin · Collagen VI

Introduction and Internet Resources

Muscular dystrophies are a group of inherited primary diseases of muscle, characterized pathologically by muscle fiber degeneration and clinically by muscle weakness. Classification of muscular dystrophies traditionally has



TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Anticuerpos empleados en el diagnóstico IHQ de Distrofinopatías y Miopatías de Cinturas

ENFERMEDAD

ANTICUERPO

Distrofinopatías Distrofina (DYS1, DYS2,DYS3)

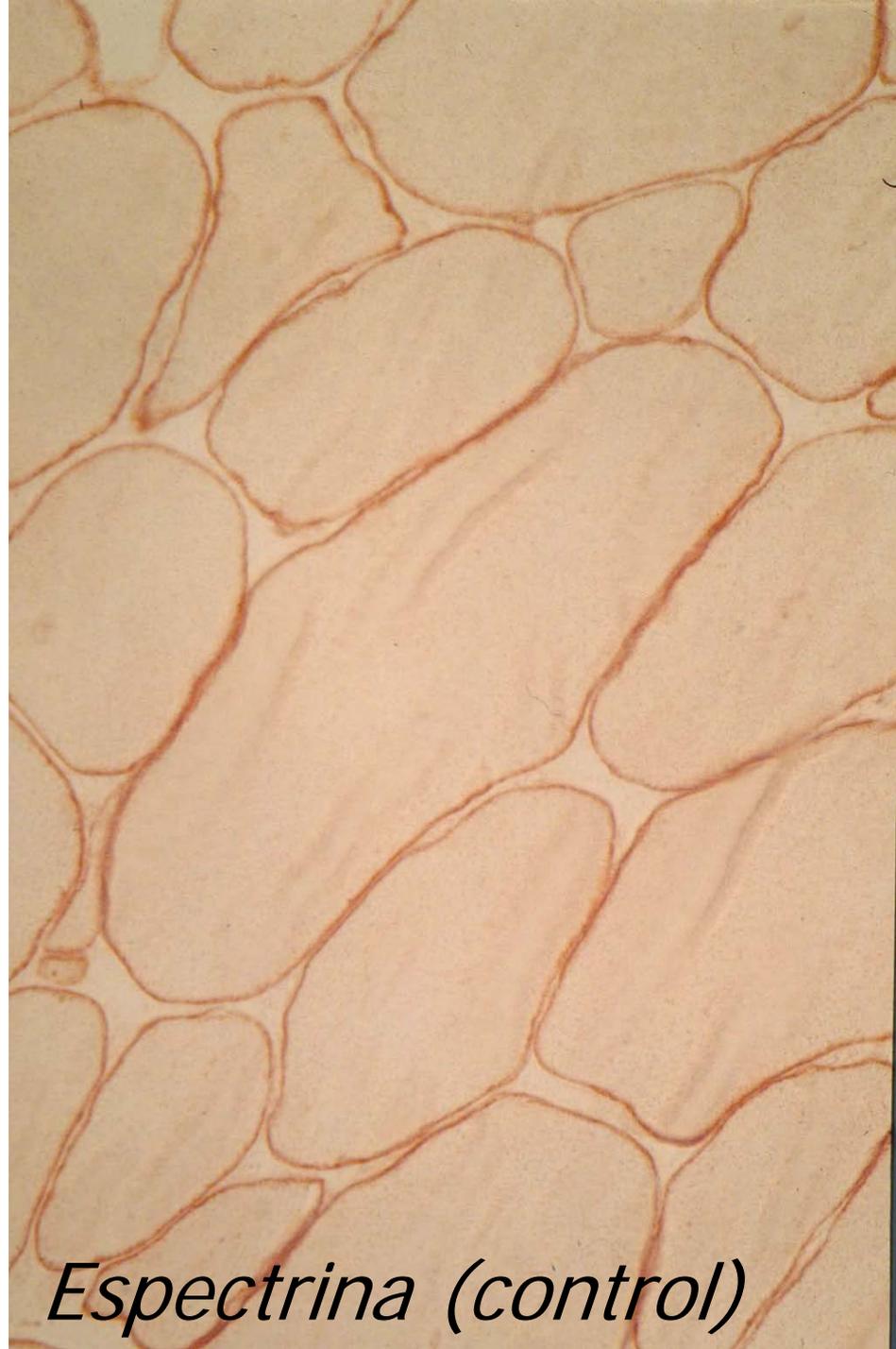
Miopatías de cinturas

DC1A Vs. Ribeteadas-Infil. Inflamatorio.....**Miotilina**
DC1B Hipotonía neonatal..... **Lamina A/C** (<2° de laminina β 1)
DC1C **Caveolina3**

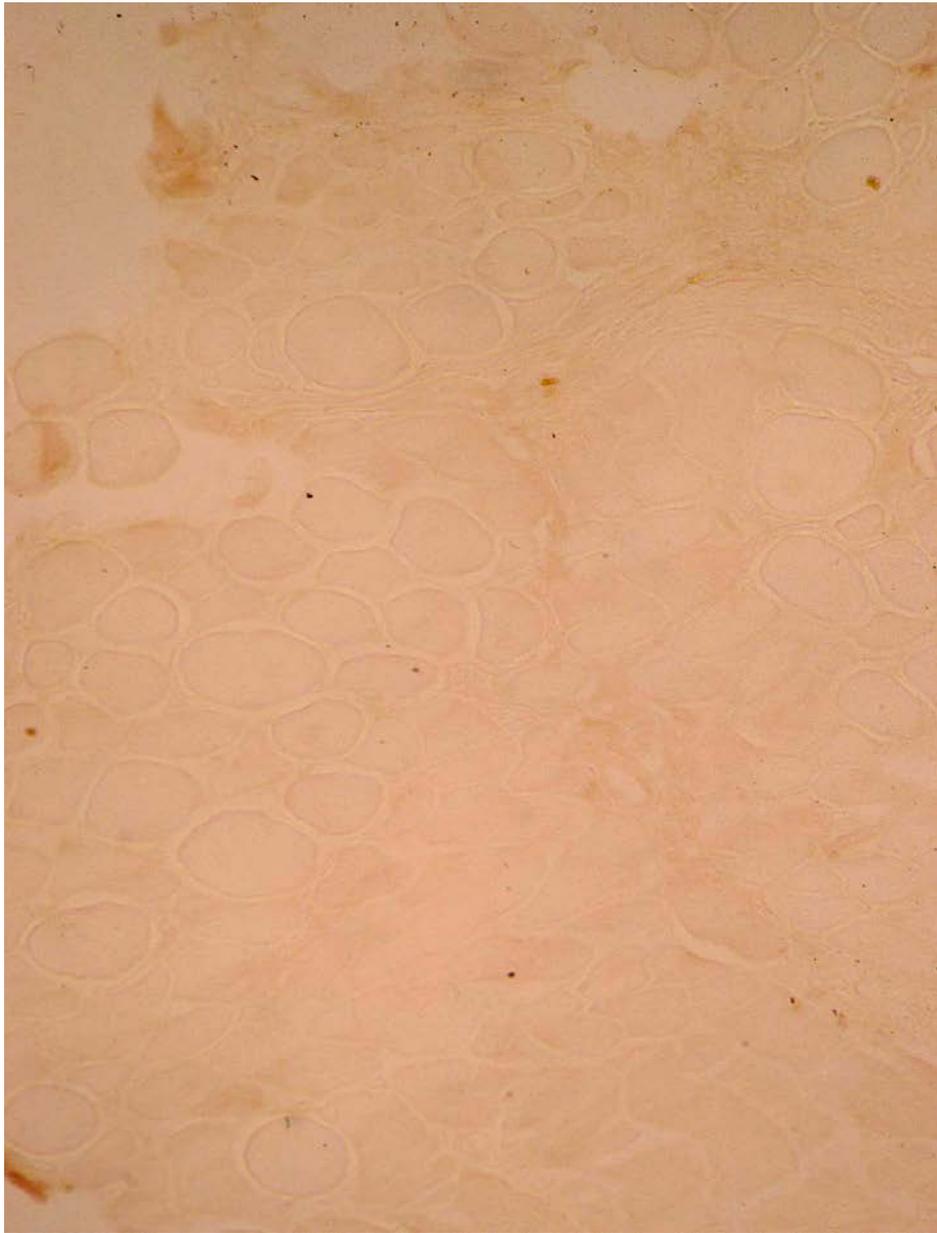
DC2A Adolesc. Inf. eosin. Fs. Lobuladas...**Calpaina (w-B)**
DC2B Infil. inflamatorio**Disferlina**
DC2C **Gamma-sarcoglicano**
DC2D **Alfa-sarcoglicano**
DC2E **Beta-sarcoglicano**
DC2F **Delta-sarcoglicano**
DC2G **Teletonina**
DC2H **TRIM 32**
DC2I **FKRP** (<2° de laminina α 2 y α -dístroglicano)
DC2J **Titina**



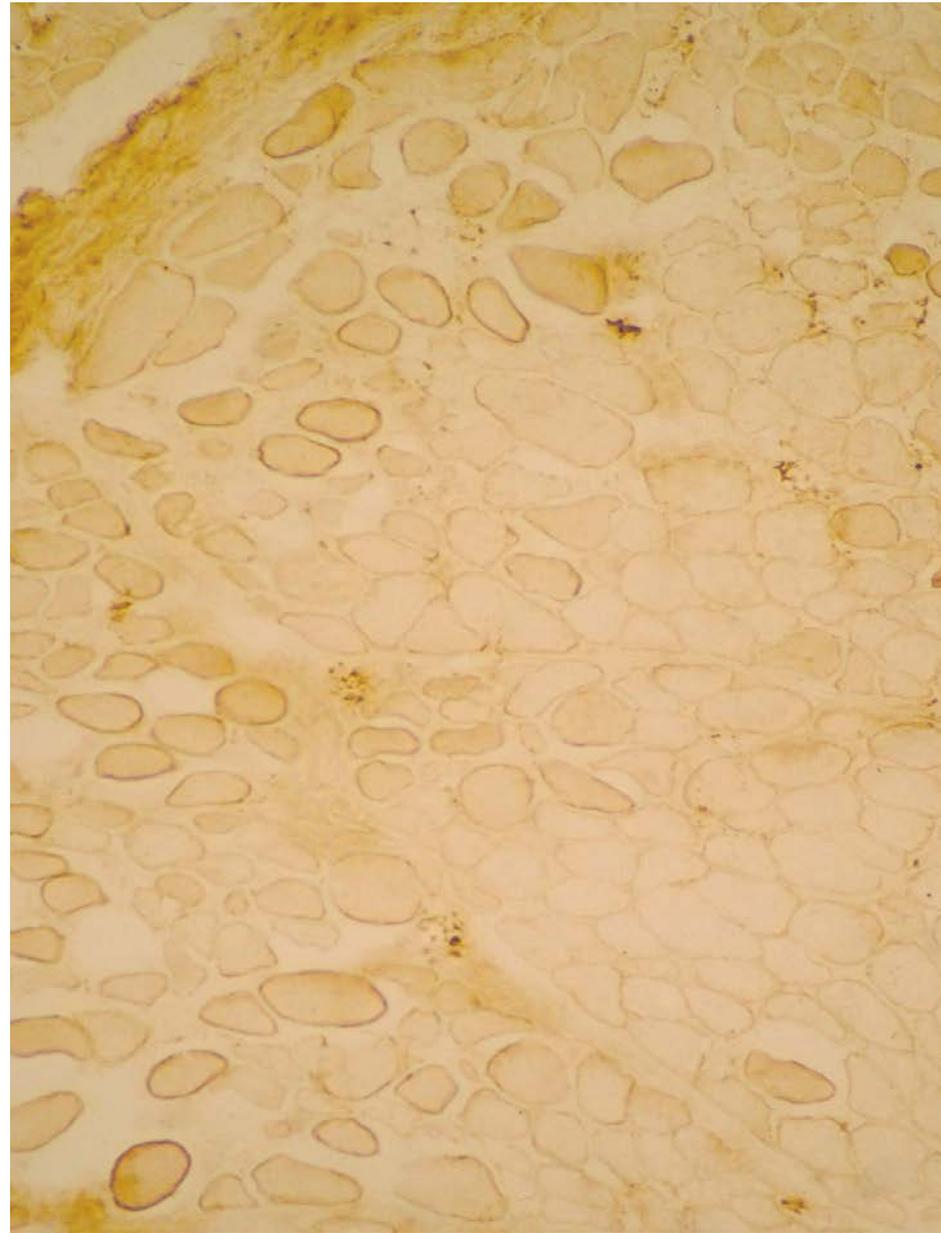
Distrofina



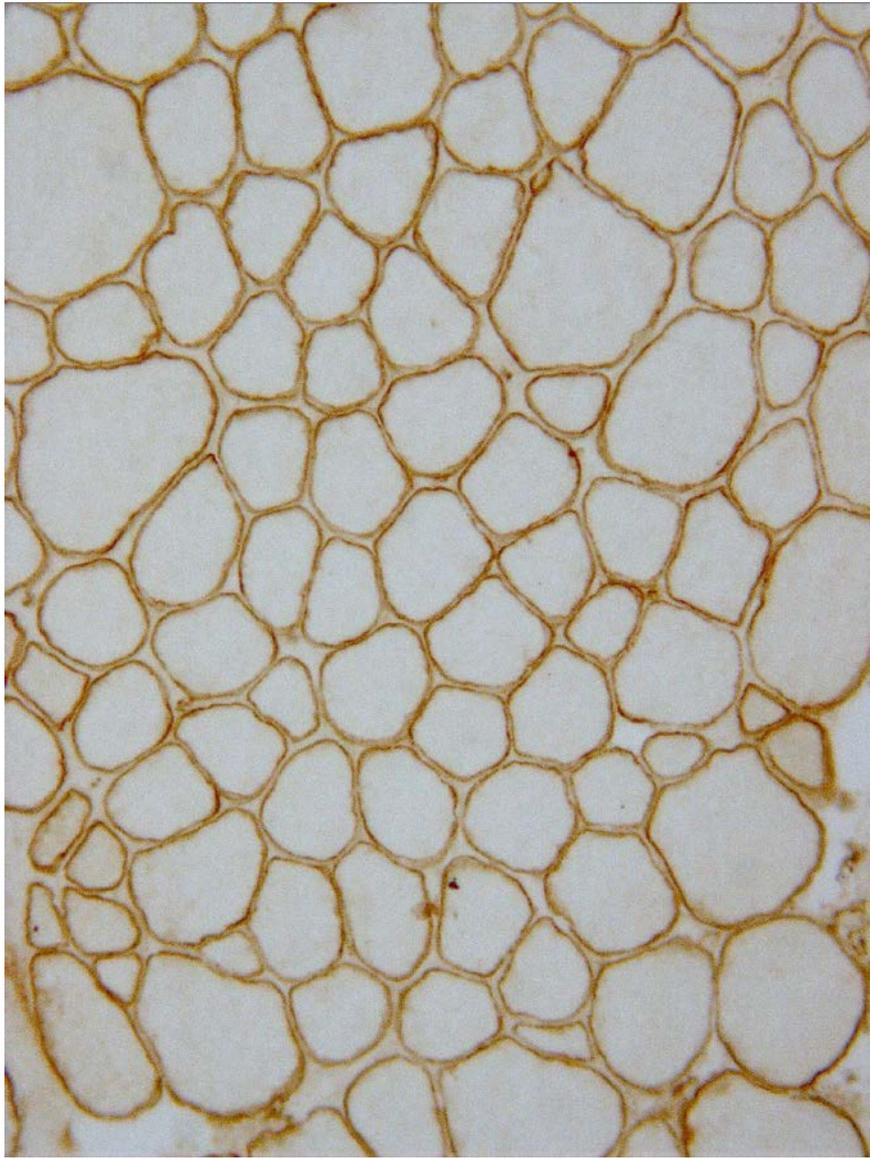
Espectrina (control)



Dystrofina-DMD

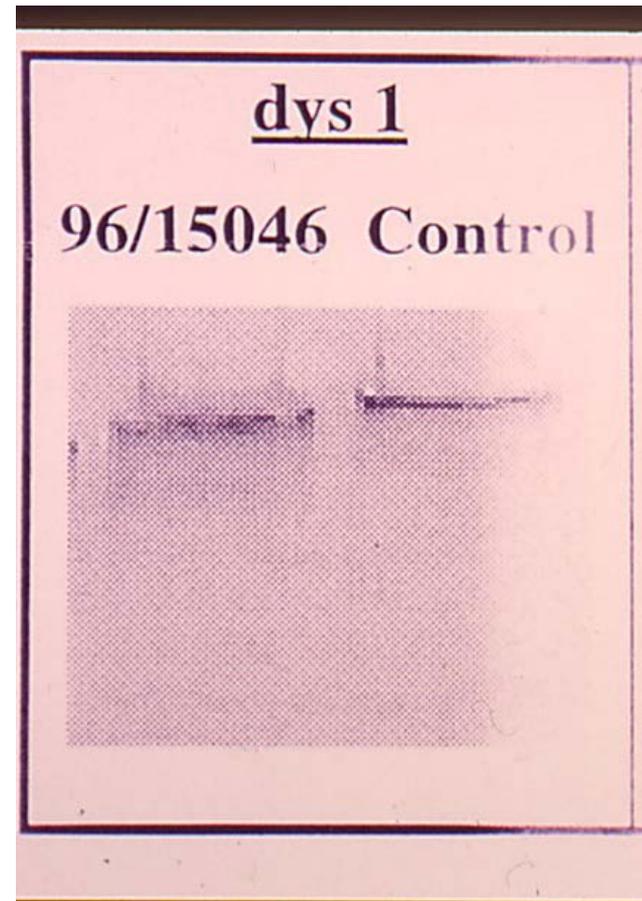


Dystrofina-DMB

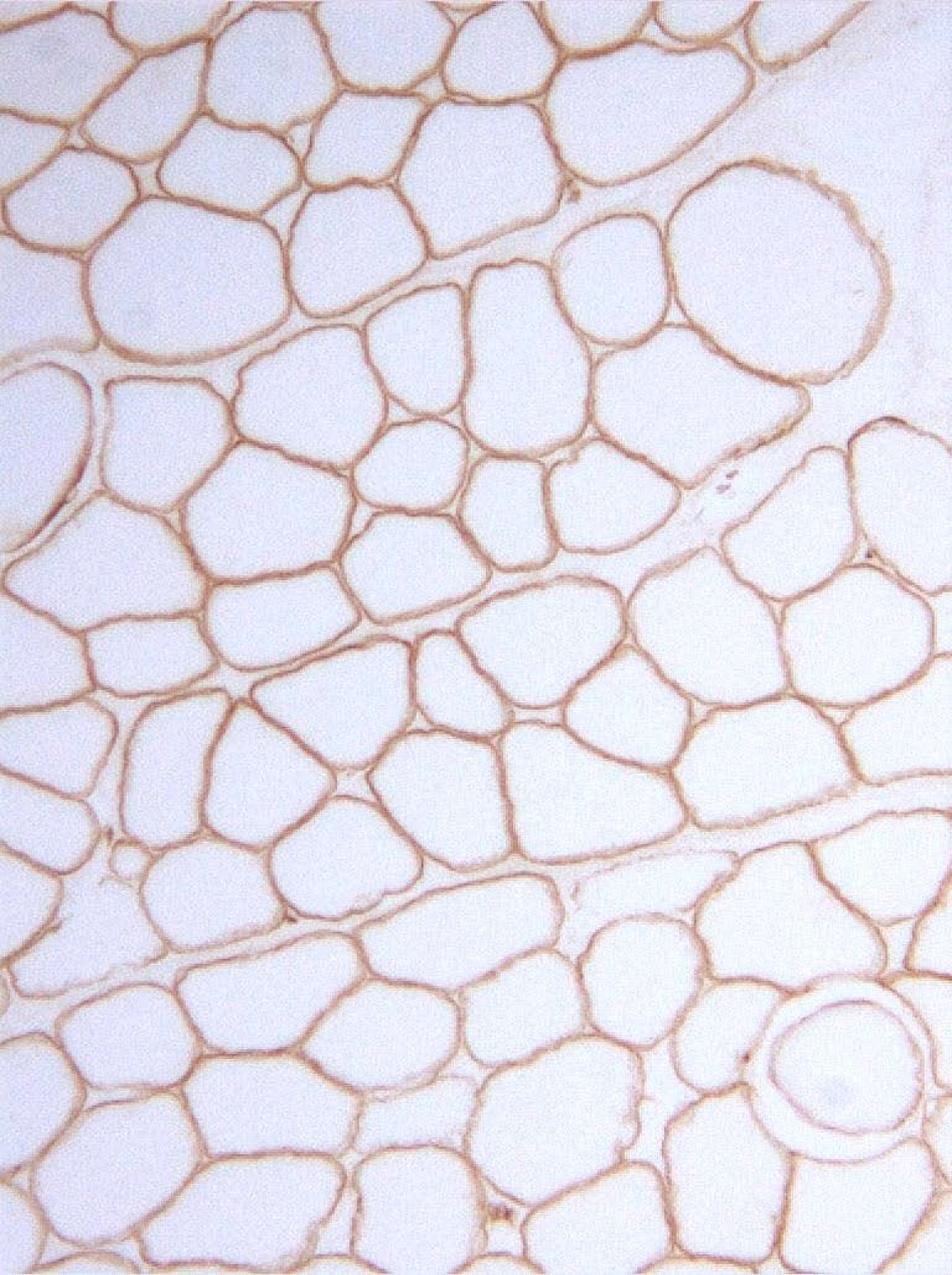


IHQ: distrofina Normal

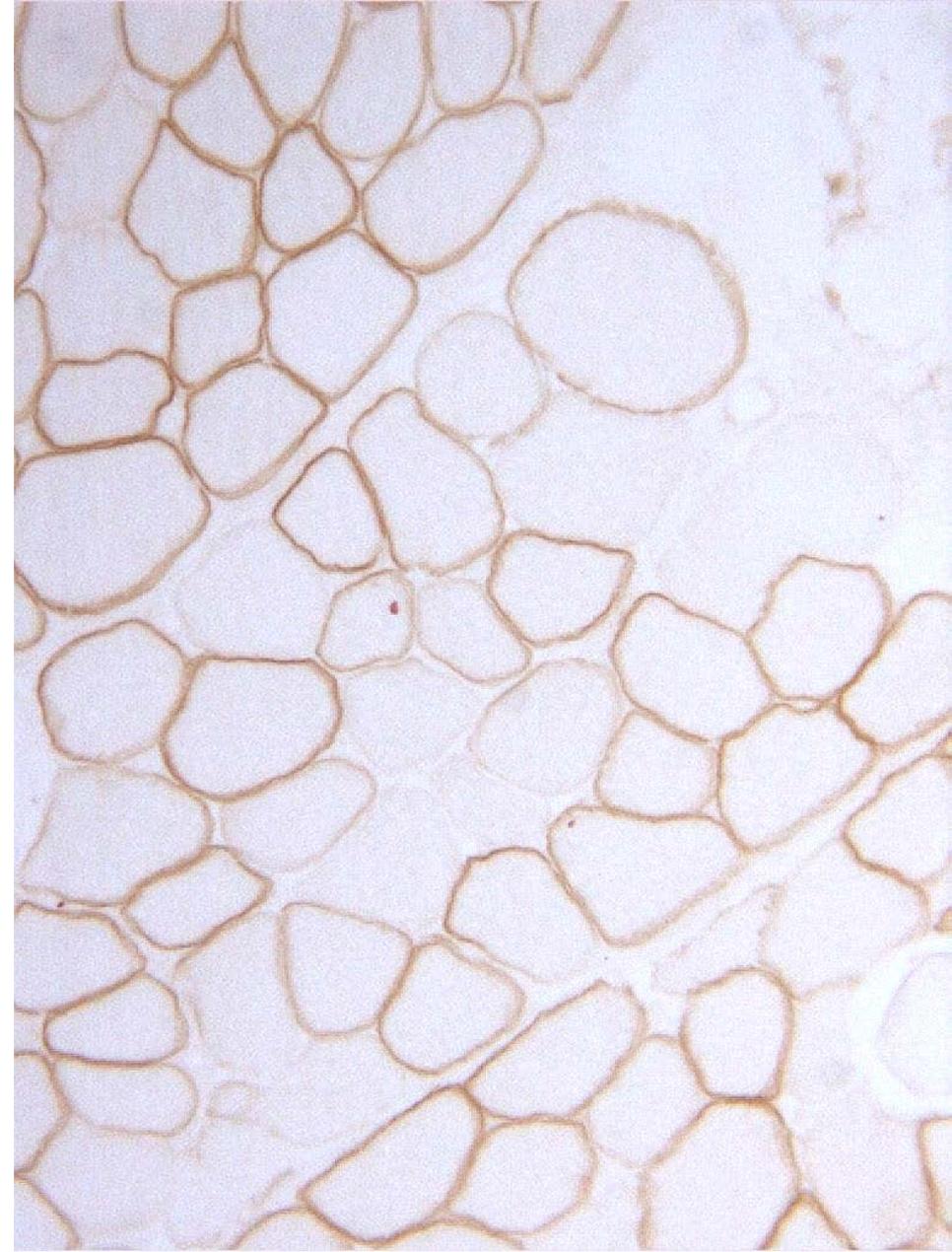
DMB



*W-B distrofina: cantidad normal
y disminución del PM*



ESPECTRINA



Portadora DMD

DISTROFINA

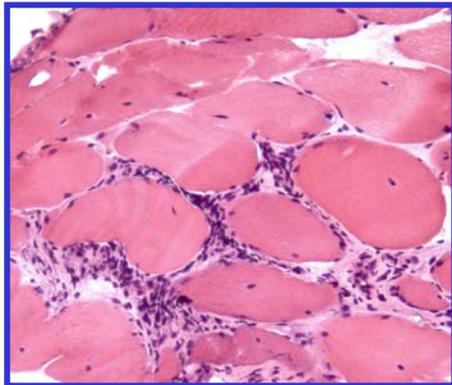
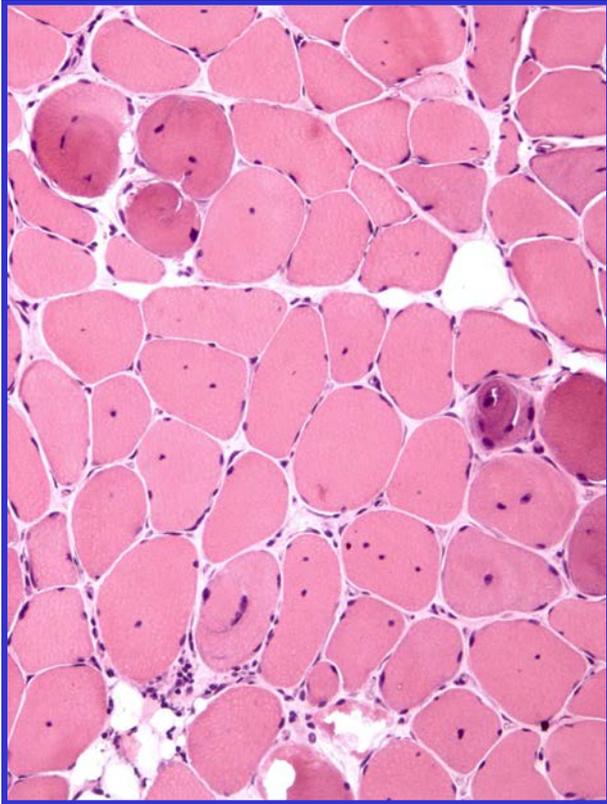
VALORACIÓN DE LAS ALTERACIONES IHQ

- *Debido a la interdependencia de las proteínas sarcolémicas y asociadas, la alteración primaria puede acompañarse de alteraciones secundarias en otras proteínas.*

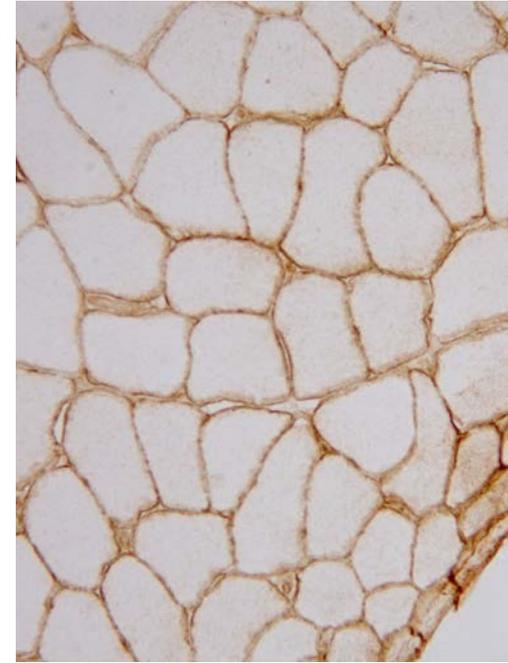
*Ejemplos de **alteraciones secundarias**:*

- En **todos o en muchos de los miembros del complejo “distrofina y proteínas asociadas”**, en casos de trastornos de este complejo.*
- En la **disferlina** en casos de distrofinopatías y sarcoglicanopatías*
- En la **calpaina 3** en casos de disferlinopatías*
- En la **disferlina** en casos de calpainopatías*
- *Confirmación del diagnóstico con W-B o con estudio genético*

DISFERLINOPATÍA (DC2B)



Ausencia de disferlina



Disferlina-control

Western Blot:

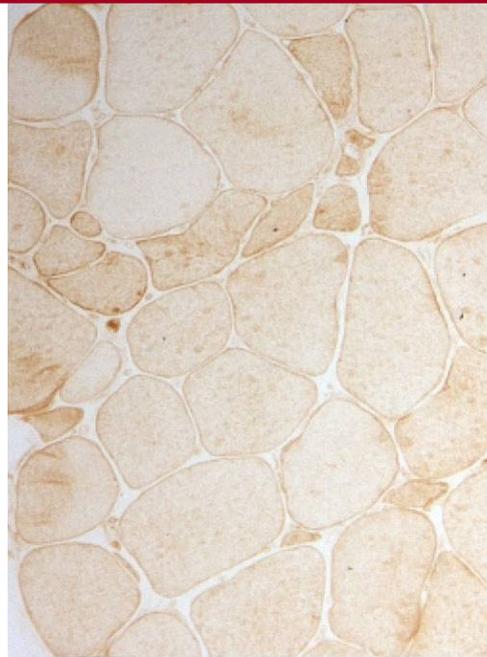
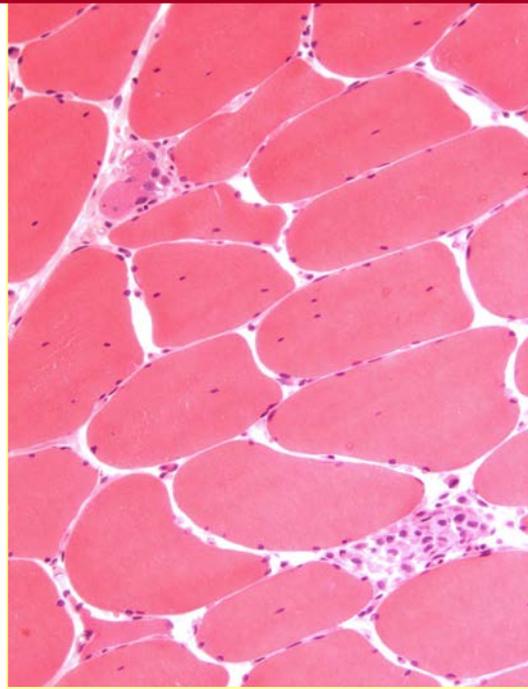
-Déficit total de disferlina

- Calpaina 3 normal

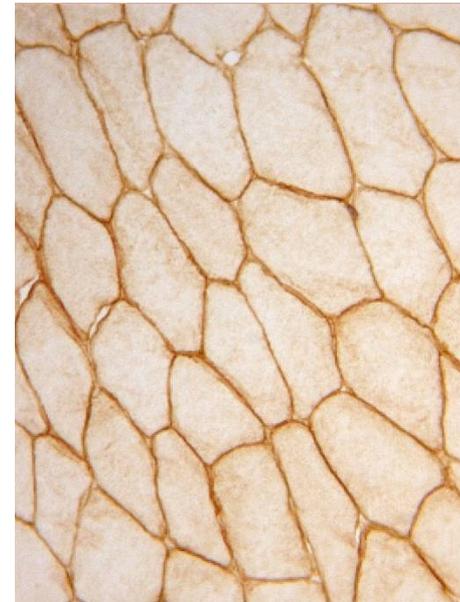
Western Blot

- *En determinados casos una proteína normal en el Western Blot no descarta la patología sospechada clínicamente, debiéndose hacer estudio genético.*

DC2A (Calpainopatía)



Disferlina

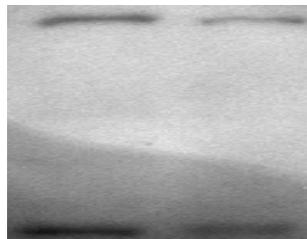
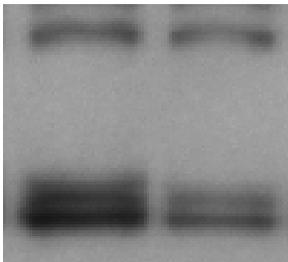


Disferlina-control

Western Blot: *Disferlina normal*
Calpaina normal

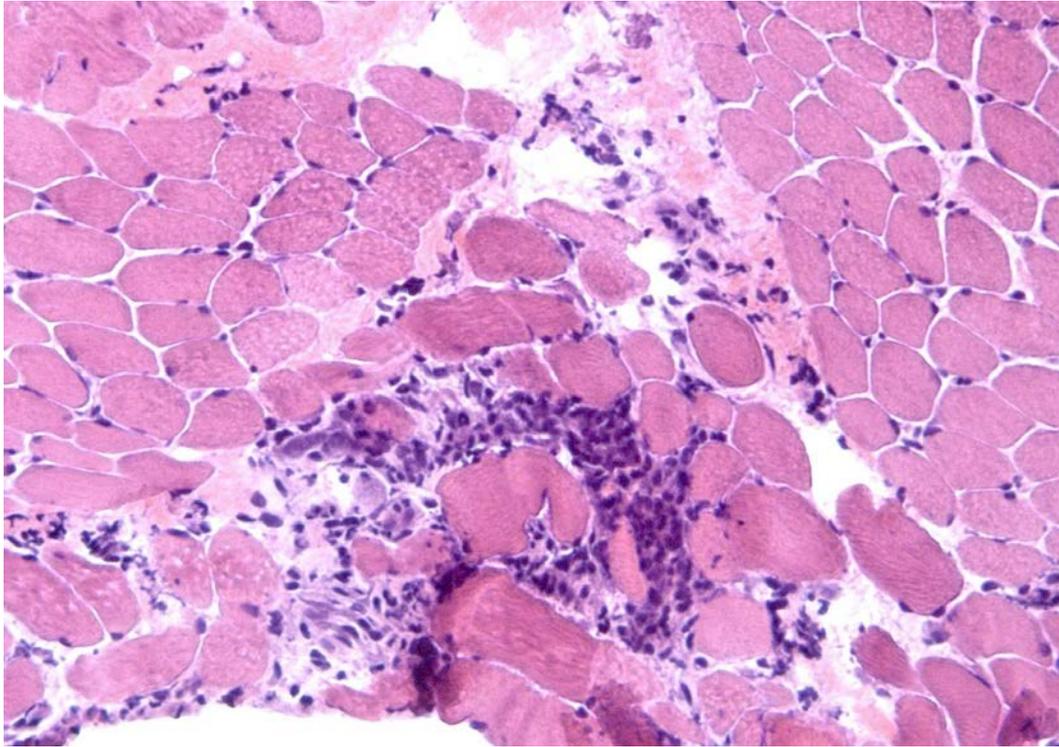
α - CALPAINA 3 94-60
CONTROL 06-8788
10 μ g 10 μ g

α - CALPAINA 3 94-30
CONTROL 06-8788
10 μ g 10 μ g



Estudio del gen de la calpaína (Dr. López de Munain): mutaciones 1910delC y K254E en el gen de la CAPN3

Infiltrados inflamatorios en calpainopatía



Varón:

-A los 14 años diagnosticado de MI y tratado con corticoides.

-Empeoramiento a los tres años, valorándose de nuevo el caso con diagnóstico de posible distrofia muscular.

*- **WB: déficit de calpaína.***

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA BIOPSIA MUSCULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES

- *Su estudio es complejo y requiere un buen procesamiento de la biopsia y la realización de técnicas especiales: Histoquímicas, Inmunohistoquímicas, Western blot y Microscopía Electrónica.*
- *Puede ser diagnóstica, mostrar cambios inespecíficos o plantear diagnósticos diferenciales entre distintos procesos.*
- *La correlación clinicopatológica es fundamental para el diagnóstico y con frecuencia son necesarias otras pruebas diagnósticas (cadena respiratoria mitocondrial, estudio genético, etc).*
- *Es probable que en el futuro disminuya el número de biopsias musculares en las enfermedades musculares hereditarias debido al gran desarrollo de nuevas tecnologías genéticas para la secuenciación del ADN, con posibilidad de secuenciar el genoma entero.*

MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN