

# **“TÉCNICAS DE HISTOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA EN PATOLOGÍA NEUROMUSCULAR: SU UTILIDAD DIAGNÓSTICA”**

*Soraya Barrera Cabañeros (TEAP)*

*Servicio de Anatomía Patológica y Neuropatología. Hospital Meixoeiro*

*Complexo Hospitalario Universitario de Vigo - CHUVI*

*Instituto de Investigación Biomédica de Vigo*

La biopsia muscular es un instrumento fundamental para el diagnóstico de las enfermedades neuromusculares. El manejo adecuado y escrupuloso de la biopsia en el laboratorio de neuropatología es imprescindible para obtener un diagnóstico certero. La muestra debe ser enviada lo antes posible después de su extracción, junto con una adecuada información de la historia clínica. Tanto la obtención de la muestra, como la orientación del tejido, y todo su posterior tratamiento, deben ser realizados con el máximo cuidado posible por personal especializado y unos medios que en no todos los hospitales existen.

A diferencia de otros tejidos, la morfología del tejido muscular esquelético se preserva mucho mejor en cortes por congelación, imposible de apreciar en tejido formolado y parafinado. Una vez orientada la muestra, se congela en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. El isopentano previene la formación de cristales de hielo y de esa manera se puede preservar toda la estructura muscular permitiéndonos realizar, no solo las técnicas histoquímicas, sino también las histoenzimáticas e inmunohistoquímicas. El almacenamiento y conservación adecuados de la biopsia muscular (en Bancos de Tejidos, si es posible) permitirá retomar su estudio para afinar el diagnóstico en el caso de descubrimiento de nuevas proteínas, obtención de nuevos anticuerpos o de nuevas técnicas y ser utilizada en investigación.

La técnica de Hematoxilina–Eosina aporta información sobre la morfología y tamaño de las fibras musculares, el número y aspecto de los núcleos, presencia de infiltrados inflamatorios, acúmulos mitocondriales, aumento de glucógeno o de lípidos. Estos detalles se pueden analizar con más detalle mediante técnicas específicas como el Tricrómico de Gomori que permite el diagnóstico de determinadas miopatías, como las mitocondriales, en las que se visualizan fibras ragged-red, que presentan acúmulos de mitocondrias, algunas miopatías congénitas como la nemalínica, o la miopatía por cuerpos

citoplásmicos. También se tiñen de rojo los agregados tubulares y las vacuolas ribeteadas (rimmed vacuoles). El PAS (Periodic Acid Schiff) es fundamental para observar depósitos de glucógeno o los cuerpos de poliglucosano y constituye una técnica de gran importancia en el diagnóstico de enfermedades metabólicas como las glucogenosis.

El patrón intermiofibrilar y la distribución de los diferentes tipos de fibras se observan con las técnicas histoenzimáticas, como la Succino-Deshidrogenasa (SDH), específica de las mitocondrias, que las tiñe de coloración azul intensa y junto a la Citocromo-Oxidasa (COX-SDH) resulta de gran ayuda en el diagnóstico de las citopatías mitocondriales. Con NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase-Tetrazolium Reductase), se tiñe de azul intenso las mitocondrias y el retículo sarcoplásmico que constituyen la red intermiofibrilar del sarcoplasma. Las alteraciones estructurales, tales como cores, fibras “target”, anulares, lobuladas o apollilladas (“moth eaten”) frecuentemente encontradas en algunas miopatías, se ponen de manifiesto mediante NADH y SDH.

Las ATPasas permiten visualizar los diferentes tipos de fibras musculares, que en condiciones normales se distribuyen adoptando una distribución en “tablero de ajedrez”, alternando fibras de tipo 1 y 2, mientras en determinadas circunstancias patológicas, como la atrofia neurógena de larga evolución se produce una agrupación por tipos de fibras como resultado de la reinervación.

Otras técnicas enzimáticas como la Miofosforilasa permiten el diagnóstico de Glucogenosis V (Enfermedad de McArdle), cuando no se observa tinción. El déficit de Mioadenilato Desaminasa (MAD) también puede ser diagnosticado mediante la ausencia de tinción histoquímica, aunque el grado de tinción puede ser variable y se pueden producir déficits secundarios a otras patologías.

El descubrimiento de diferentes proteínas del sarcolema, sarcoplasma o del núcleo de las fibras musculares y su estudio inmunohistoquímico ha modificado de forma notable la clasificación de las Distrofias Musculares y ha hecho posible llegar a un diagnóstico exacto de éstas. Dada la complejidad y la estrecha relación entre las diferentes proteínas, el número de anticuerpos a analizar debe ser numeroso y dirigido. No todas las enfermedades debidas al déficit de una proteína presentan una ausencia total de la misma siendo difícil su valoración, por lo que requiere especialistas en este campo.

En la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) se observa una ausencia total de inmunomarcaje para la proteína distrofina, exceptuando la fibras “revertans”, con marcaje positivo en un porcentaje generalmente inferior al 5% de las fibras musculares y secundariamente disminuye o desaparece el inmunomarcaje del complejo de proteínas asociadas a la distrofina, DAP (*Dystrophin-Associated Proteins complex*) debido a la desestabilización del complejo proteico. Paralelamente se produce una sobreexpresión de DRP2 (*Dystrophin-Related Protein*) en un intento de suplir la ausencia de distrofina.

Otras distrofias muculares presentan mayor dificultad interpretativa del estudio inmunohistoquímico, como la Distrofia Muscular de Becker (DMB) en la que el inmunomarcaje de distrofina suele ser irregular y tenue, a veces con fibras negativas en alguno de los dominios de la proteína. Las portadoras sintomáticas presentan un patrón de expresión de distrofina en mosaico, con grupos de fibras positivas y otros grupos negativos, sobreexpresión de DRP2 en las fibras distrofina-negativas y ausencia de sobreexpresión en las fibras normales.

En las Sarcoglicanopatías, además del déficit de la proteína mutada (alfa, beta, gamma o delta sarcoglicano), se produce una alteración en la expresión del resto de las proteínas del complejo DAP.

## **Bibliografía**

1. Dubowitz V. Histological and histochemical stains and reactions. En: Dubowitz V, editor. Muscle biopsy: a practical approach. Londres: Ed. Saunders Elsevier, 2007.
2. Navarro C, Teijeira S.  
Miopatología. Nuevo concepto. Nuevo laboratorio  
Neurología, 2004;19:168-82.
3. Structural and Molecular Basis of Skeletal Muscle Diseases  
Gerorge Karpati (volume ed.)  
Maria Molnar, Hans H. Goebel, Kiichi Araata, Alan E. H. Emery, Eric Hoffman,  
and Eric Stoubridge (advisory eds)  
Neuropathology Press, Zurich, 2002

4. Myology: Basic and Clinical  
Andrew Engel, Betty Q. Banker  
McGraw-Hill Education, 2004

**“ESTUDIO DE PROTEÍNAS MUSCULARES POR WESTERN BLOT Y TÉCNICAS DE GENÉTICA APLICADAS A LAS ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES: PCR, RFLP Y SECUENCIACIÓN”**

*Dra. Irene Viéitez*

*Servicio de Anatomía Patológica y Neuropatología – Hospital Meixoeiro*

*Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI)*

*Instituto de Investigación Biomédica de Vigo*

Las enfermedades neuromusculares (ENM) engloban más de 150 enfermedades que afectan al sistema nervioso o, de forma aislada, al músculo, y en su mayoría son de origen genético. Estas enfermedades son incapacitantes, progresivas y mayoritariamente sin tratamiento eficaz, excepto el sintomático, lo que conlleva una gran repercusión social, laboral y económica. Aunque estas enfermedades afectan en conjunto a un número considerable de individuos, la gran variedad de entidades nosológicas descritas hace que cada enfermedad, considerada aisladamente, tenga una baja prevalencia y por lo tanto, estén consideradas como “enfermedades raras”.

El descubrimiento de la distrofina y el gen que la codifica en 1987 supuso un punto de inflexión a partir del cual se fueron identificando nuevos genes y proteínas implicadas en otras enfermedades neuromusculares. Esto permitió conocer en gran medida la estructura molecular de la fibra muscular, así como la relación entre proteínas musculares y de la matriz extracelular. Además de las ENM que afectan a nervio y unión neuromuscular, se han descrito más de 40 distrofias musculares individualizadas genéticamente, pero a menudo son escasamente conocidas y de difícil diagnóstico debido al solapamiento de los cuadros clínicos.

Dentro de las distintas metodologías utilizadas para establecer el diagnóstico molecular de una enfermedad están las que se aplican a nivel genético, a partir de ADN del paciente, generalmente extraído de sangre periférica o de la misma biopsia muscular. Una de las técnicas más habituales es el análisis directo de mutaciones mediante enzimas de restricción (PCR-RFLP). Esta técnica es muy útil en la identificación de mutaciones frecuentes, como es el caso de la glucogenosis tipo V, en la cual, el estudio por PCR-RFLP de tres mutaciones en el gen responsable de esta enfermedad (*PYGM*) permite detectar estas mutaciones en el 60% aproximadamente de los pacientes. En cambio, en un elevado número de casos, las mutaciones que producen enfermedades neuromusculares son de muy baja frecuencia por lo que es de gran utilidad la secuenciación de los genes para la búsqueda de las mutaciones responsables de una enfermedad. Además, la secuenciación es una herramienta esencial para los estudios de ligamiento o de genes candidatos, ya que permiten identificar aquéllos implicados en una determinada enfermedad.

Por otra parte, existen metodologías de diagnóstico molecular que se aplican a nivel proteico. Entre ellas, la más empleada es la técnica de Western blot o inmunoelectroforesis, que permite realizar una cuantificación proteica, observando la ausencia, sobreexpresión o déficit parcial de una proteína muscular, además de poder determinar si existen alteraciones en el tamaño de una proteína específica. En las distrofinopatías, por ejemplo, cobra una gran relevancia esta técnica ya que permite establecer un diagnóstico diferencial entre dos cuadros clínicos producidos ambos por alteraciones en el gen de la distrofina, la distrofia muscular de Duchenne, con ausencia total de distrofina, y la distrofia muscular de Becker, en la que se produce una distrofina anómala, generalmente de menor peso molecular y en menor cantidad.

La aplicación de los estudios moleculares en el campo de la medicina, en particular en el estudio de las enfermedades neuromusculares ha supuesto un cambio drástico en el modo de enfocar el diagnóstico, tanto para establecer su etiología como para aplicar una posible terapia o realizar un consejo genético.

#### **Bibliografía:**

1. Overview of molecular genetic diagnosis. Harada S, Korf BR. *Curr Protoc Hum Genet* 2013; Chapter 9:Unit9.1.
2. Molecular and clinical study of McArdle's disease in a cohort of 123 European patients. Identification of 20 novel mutations. Viéitez I, Teijeira S, Fernández JM, San Millán B, Miranda S, Ortolano S et al. *Neuromusc Disord*, 2011;21(12):817-23.
3. A novel MYH7 mutation linked congenital fiber type disproportion and myosin storage myopathy. Ortolano S, Tarrío R, Blanco-Arias P, Teijeira S, Rodríguez-Trelles F, García-Murias M et al. *Neuromusc Disord* 2011;21(4):254-62.
4. Molecular diagnosis of muscular dystrophies, focused on limb girdle muscular dystrophies. Navarro C, Teijeira S. *Expert Opin Med Diagn*. 2009;6:631-647.
5. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kundel LM. *Cell* 1987, 51(6):919-928.

## **“Utilidad de la Microscopía Electrónica en el diagnóstico de las enfermedades neuromusculares”**

*Beatriz San Millán Tejado*

*Servicio de Anatomía Patológica y Neuropatología, Complejo Hospitalario*

*Universitario de Vigo (Meixoeiro)*

*Instituto de Investigación Biomédica de Vigo*

La microscopía electrónica (ME) ocupa un lugar estratégico en el diagnóstico de algunas enfermedades neuromusculares no diagnosticables mediante microscopía óptica. Permite en muchos casos entender el mecanismo fisiopatológico e incluso orientar el estudio molecular.

La biopsia de músculo esquelético o del nervio periférico se obtiene tras un estudio detallado clínico, analítico y electrofisiológico de los pacientes con sospecha de enfermedad neuromuscular. Las muestras se procesan para estudio histológico, histoquímica e inmunohistoquímico. Tras realizar estos exámenes, el neuropatólogo decide la necesidad de efectuar un estudio ultraestructural, ya que se trata de un procedimiento que requiere formación y dedicación específicas. Las muestras, sin embargo, se deben incluir en resina de forma rutinaria en todos los casos, realizándose cortes semifinos y ultrafinos para su posterior examen.

La introducción de la microscopía electrónica en el estudio de las enfermedades neuromusculares constituyó una aportación fundamental en el conocimiento de la morfología normal y patológica del músculo esquelético y del nervio periférico. Con ello aumentó de manera sustancial el rendimiento de estas biopsias, herramienta diagnóstica fundamental a pesar de la creciente importancia de la inmunohistoquímica y de la biología molecular en las enfermedades neuromusculares.

Además de revelar nuevos datos sobre las estructuras observables mediante microscopía óptica como el sarcoplasma o el núcleo, la ME identificó estructuras hasta entonces poco conocidas, como las mitocondrias, el aparato de Golgi, los lisosomas, la estructura sarcomérica o el sistema sarcotubular.

El estudio ultraestructural sistemático permitió conocer alteraciones patognomónicas de determinadas enfermedades neuromusculares, cuya relevancia diagnóstica continúa vigente en la actualidad, como las observables en muchas miopatías congénitas, metabólicas, tóxicas o inflamatorias. También permite confirmar

el diagnóstico sugerido por el estudio inmunohistoquímico en las miopatías con déficit de proteínas del sarcolema, la matriz extracelular o la membrana nuclear y es particularmente relevante en las enfermedades con alteraciones del sarcoplasma, tales como las miopatías vacuolares, la miositis por cuerpos de inclusión, la miopatía por agregados tubulares, las enfermedades mitocondriales o las miopatías miofibrilares, siendo una herramienta clave en su diagnóstico diferencial.

Entre las miopatías vacuolares, el estudio ultraestructural permite caracterizar la presencia o no de membrana delimitando la estructura vacuolar, el contenido de las mismas, su carácter autofágico o lisosomal e incluso identificar un subgrupo en el que la membrana vacuolar contiene una lámina basal interna, similar a la que rodea al sarcolema, que constituyen las “miopatías vacuolares de características sarcolémicas”, como la enfermedad de Danon o la miopatía vacuolar autofágica hereditaria ligada a X (X-MEA).

La ME es un método accesible y fiable para la caracterización del material de depósito en las distintas enfermedades metabólicas, permitiendo un diagnóstico certero de determinadas glucogenosis, lipidosis, ceroidolipofuscinosis y otras; identificando depósitos de amiloide o estructuras características como los cuerpos de Lafora o el material granular osmiofílico (GOM) del CADASIL.

Existen además estructuras no identificables mediante microscopía óptica como las espirales cilíndricas, las inclusiones en huella digital, las inclusiones tipo “cap”, las inclusiones filamentosas intranucleares de la distrofia óculo-faríngea o de la miositis por cuerpos de inclusión o las inclusiones túbulo-reticulares de las células endoteliales características de la dermatomiositis.

En la biopsia de músculo esquelético o de nervio periférico, es importante el estudio minucioso no sólo de las fibras musculares o nerviosas, sino de las estructuras vasculares y los fibroblastos del peri y endomisio, que en muchas enfermedades pueden reflejar la patología subyacente, como en la Enfermedad de Pompe o en la de Fabry.

En conclusión, la microscopía electrónica es una herramienta de gran interés y utilidad en el estudio de la patología neuromuscular, cuyas principales indicaciones con fines diagnósticos, son las enfermedades metabólicas, las miopatías miofibrilares y las miopatías vacuolares, además del extenso grupo de las miopatías congénitas. Potencialmente, el estudio ultraestructural puede ayudar a entender el mecanismo fisiopatológico de las enfermedades neuromusculares, en su mayoría poco conocido, e incluso orientar el estudio molecular y genético.



## **Bibliografía:**

1. Goebel HH, Stenzel W. Practical application of electron microscopy to neuromuscular diseases. *Ultrastruct Pathol.* 2013 Feb; 37(1):15-8.
2. Papa V, Tarantino L, Preda P, Badiali De Giorgi L, Fanin M, Pegoraro E, Angelini C, Cenacchi G. The role of ultrastructural examination in storage diseases. *Ultrastruct Pathol.* 2010 Oct;34(5):243-51
3. Fernandez C, Figarella-Branger D, Meyronet D, Cassote E, Tong S, Pellissier JF. Electron microscopy in neuromuscular disorders. *Ultrastruct Pathol.* 2005 Nov-Dec; 29(6):437-50.
4. Hirano A. The role of electron microscopy in neuropathology. *Acta Neuropathol.* 2005 Jan; 109(1):115-23. Epub 2005 Jan 12
5. Lloreta-Trull J. The role of the electron microscope in the study of muscular diseases *Rev Neurol.* 2003 Oct 16-31; 37(8):787-9.