

117
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

METODOS HISTOLOGICOS Y
ULTRAESTRUCTURALES PARA LA INTERPRETACION
Y DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES MUSCULARES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ARACELI MIRANDA VEGA

MEXICO, D. F.

1994



FACULTAD DE CIENCIAS
DIRECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) Miranda Vega Araceli

con número de cuenta 8122698-4 con el Título: _____

Metodos histologicos y ultraestructurales para la
interpretación y diagnóstico de Enfermedades Musculares

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y considerámos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
	<u>Dra. Fernanda Teixeira</u>		
Director de Tesis	<u>Dra. Clara Esquivel Huesca</u>		
	<u>M. en C. Marco Antonio Marrínez Avila</u>		
	<u>E. M. E. A. C. B. Marco Antonio González Jimenez</u>		
Suplente	<u>M. en C. Viktor J. Romero Díaz</u>		
Suplente			

Indice

1. Introducción	1
2. Antecedentes Históricos	2
3. Origen Embriológico	6
4. Estructura del Músculo Normal	9
5. Objetivos	32
5.1 Metodos Histoquímicos	33
5.2 La Biopsia Muscular	41
5.3 Citoarquitectura del Músculo	45
5.4 Cambios Patológicos de la Biopsia Muscular	48
6. Material y Método	66
7. Tecnicas Histoquímicas	70
8. Resultados y Comentarios	74
8.1 Distrofia Muscular Duchenne	83
8.2 Distrofia Tipo Becker	87
8.3 Distrofia Muscular de Cinturas	88
8.4 Distrofia Facio-Escapulo-Humeral	94
8.5 Enfermedades de la Neurona Motora Baja	95
8.6 Atrofia Muscular Espinal	106
8.7 Síndromes Miotónicos	110
8.7.1 Miotonía Congénita	110
8.7.2 Distrofia Miotónica	111
8.8 Miopatías Congénitas	113
8.8.1 Miopatía de Corazones Centrales	113
8.8.2 Miopatía Nematónica	117
8.8.3 Miopatía con Agregados Tubulares	122
8.9 Miopatía Mitocondriales	127
8.10 Deficiencia de Carnitina	134
8.11 Distrofia Muscular Oculofaríngea	138
8.12 Polimiositis	143
8.13 Atrofia de Fibras T 2	146
8.14 Atrofia Universal de Fibras	148
8.15 Hipertrofia de Fibras	151
9. Discusión y Conclusiones	155
10. Bibliografía	159

A Mis Padres

Gracias por todo el amor, el respeto y apoyo, así como su ejemplo en la vida para seguir luchando y conseguir los grandes logros que dan satisfacción a la existencia.

Gracias por su paciencia, por la ayuda y por enorme estímulo para concretar la carrera y finalizar esta tesis, sin ustedes este esfuerzo no se hubiese concluido.

Para ustedes con todo mi amor.

A Mis Hermanos

Rosa Ma. Sergio y Victor G.

Por su gran cariño incondicional de siempre, por el apoyo que han representado para mí, y por el estímulo que me da para seguir adelante.

A Mis Sobrinos

Victor Rodrigo, Sergio, María Fernanda
Victor Gerardo y Christian.

Por ser la alegría diaria, por compartir sus juegos y sus risas y por el amor que para mí representan.

Gracias por ser la motivación para ayudar a a otros niños.

Dra. Fernanda Teixeira

Un agradecimiento muy especial, por brindarme la oportunidad de trabajar, a su lado, por la confianza depositada para compartir sus conocimientos, por sus valiosos consejos y asesorías para realizar esta tesis y por ser una amiga dentro y fuera del trabajo.

Gracias a la Dra. Clara Esquivel Huesca, al M. en C. Marco Antonio Martínez Avila, al Esp. en Micros. Electronica. Marco Antonio Gonzalez Jimenez y al M. en C. Viktor Romero Díaz, por aceptar hacer la revisión de este trabajo, gracias por su tiempo y sus observaciones.

A la secretaria Isabel Trejo por su valiosa ayuda, colaboración y paciencia para la impresión final de trabajo.

Un agradecimiento más a todos aquellos amigos que de una o de otra forma me apoyaron y alentaron para el durante la carrera y la parte profesional de mi vida. Así como aquellos que ya no pudieron compartir conmigo estos momentos.

Agredezco al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía " Dr. Manuel Velazco Suárez". Por permitirme desarrollar este trabajo dentro de esta excelentísima institución.

A mis compañeros de trabajo en el laboratorio Viktor y Alma por su paciencia durante la realización de esta tesis.

A todos los pacientes para quienes este trabajo represento un apoyo y esclarecimiento diagnóstico. Gracias por permitirme ayudarlos, a todos ellos mi más profundo respeto.

A todos los anteriormente mencionados y los que no lo estan, pero no por eso olvidados, GRACIAS.

1. INTRODUCCION

El presente trabajo se realizó con la inquietud de conocer profundamente las enfermedades musculares que se estaban presentando en el Instituto Nacional de Neurología Neurocirugía "Dr. Manuel Velasco Suárez", y sobre las cuáles no se tenía una recopilación de cambios patológicos completos de estas enfermedades, por lo que era necesario, tener estudios detallados sobre las mismas para poder establecer un diagnóstico histopatológico, con bases firmes, que apoyaran, u orientaran el diagnóstico clínico. Para esta labor se recurrieron a las técnicas histológicas e histoquímicas y de microscopía electrónica, que ya se manejaban en el laboratorio de Neuropatología Experimental, donde se realizó, este trabajo. La variedad de enfermedades musculares estudiadas, así como sus cambios patológicos relacionados revelados con las distintas técnicas empleadas, fueron de gran interés, para el propósito de diagnóstico de las entidades, por lo que se recopilaron en el presente trabajo, para ayuda de las personas interesadas en enfermedades musculares. Es de señalarse que todas las fotografías y las micrografías que aparecen en el texto son originales del autor.

2. ANTECEDENTES HISTORICOS

TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES.

Stefano Lorenzini en 1678 observó la diferencia entre los músculos de animales con respecto a su color, reconociendo dos músculos el blanco y el rojo. Ciaccio en 1898 intenta explicar esta diferencia de color a niveles fisiológicos y estructurales. Ranvier (1873, 1890) estudió en conejos las diferencias fisiológicas relacionadas con los tipos de contracciones, encontrando dos tipos, las lentas y las rápidas. En 1884 Grutzner probó que había una relación entre las fibras oscuras de la rata y las fibras rojas del conejo., realizando estos estudios en otros animales concluyó que todos los vertebrados contaban con dos tipos de fibras musculares, unas más delgadas y oscuras y otras mayores y claras. El atribuyó el color obscuro de las fibras a gránulos del sarcoplasma. Kollenker, a principios de 1857, sugiere que el metabolismo de las fibras musculares se encontraba relacionado a gránulos intersticiales. Fue hasta 1890 que Retzius llama a los gránulos sarcosomas.

Hacia el año 1881 Knoll sigue manteniendo que la diferencia de color era debido al protoplasma que se encontraba en mayor cantidad en las miofibrillas de las fibras oscuras que en las fibras claras, por lo que dividió al músculo en fibras ricas y fibras pobres en protoplasma. Además estableció que los músculos que tenían una actividad constante, como por ejemplo, los músculos oculares, los de masticación y los de respiración se encontraban compuestos principalmente de fibras oscuras. Otros estudios que realizó en animales le revelaron que, algunos músculos se encontraban compuestos por ambos tipos de fibras. Otra conclusión a la que llegó, fue la de que, los gránulos por sus características, eran de naturaleza lipídica. Lee, Guenther y Meleney (1916) estudiaron los músculos digitorum longus, gastrocnemio y soleo del gato y encontraron diferencias químicas y fisiológicas entre estos músculos, pero no histológicas. Bullard (1919) con el método de Sudán III para lípidos encontró que los músculos tenían tres tipos de fibras : claras, oscuras e intermedias; además de que había una variación en la proporción y en el tamaño de las fibras de diferentes músculos. En 1929. Denny-Brown también observaron que las fibras de diferentes músculos de gato contenían una mayor cantidad de grasa que las fibras oscuras del músculo pero no demostraron la relación de las características histológicas con la velocidad de contracción del músculo.

Con el método de la centrifugación diferencial propuesta por Bensley y Hoerr (1934) para la separación estructural de los componentes celulares del hígado, se pudo localizar ciertas enzimas de las fibras musculares y mitocondrias donde se demostró la actividad respiratoria.

Relacionando la densidad mitocondrial a la actividad respiratoria en diferentes tipos de músculo, Paul y Sperleng (1952) demostraron que el músculo rojo tenía una alta actividad respiratoria enzimática alta, mientras el músculo blanco tenía baja tanto la densidad mitocondrial como la actividad respiratoria. Con el advenimiento de la histoquímica se facilitó la localización de sistemas enzimáticos, además de que otros constituyentes químicos a nivel celular, estableciéndose así la relación directa de la actividad funcional de las fibras individuales con su morfología. Las enzimas que se estudiaron tenían relación con la síntesis de glucógeno y su degradación (como las fosforilasas), las oxidoreductasas relacionadas con el ciclo de Krebs, y las hidrolasas como las ATPasa. En 1935 Semenovoff empleó la técnica clásica del azul de metileno para deshidrogenasa succínica y observó variación en la actividad enzimática de las fibras individuales del músculo de anfibio. Aplicando el método más sensitivo de deshidrogenasa succínica descrito por Seligman y Rutenburg en 1951, Padykula en 1952 demostró una variación similar de la deshidrogenasa succínica en el músculo de la rata. En 1955 Wachstein y Meisel observaron que el diafragma y el masetero poseen una gran cantidad de fibras que reaccionan más fuerte que los músculos de los miembros. Nachmias y Padykula en 1958 con la misma técnica demostraron que todas las fibras del músculo soleo que es rojo, tienen una reacción igualmente intensa, mientras que en los músculos mixtos como el biceps, femoral y tibial anterior, la reacción de las fibras variaba ampliamente y la reacción fué más intensa en las fibras de menor diámetro, por lo que concluyeron, que tenían mayor contenido de mitocondrias por unidad de área. Ogata (1958a) reconoció tres tipos de fibras en animales superiores; fibras grandes y blancas con actividad enzimática débil; fibras rojas y pequeñas con gran actividad enzimática y fibras intermedias en tamaño y actividad enzimática, las cuales estuvieron presentes en proporción variable en los diferentes músculos. Con la aplicación de los métodos enzimáticos adicionales se estableció una variación similar en la actividad del citocromo oxidativo en los músculos de gato y ratón. Ogata (1958) observó lo mismo para las diaforasas DPN (difosfopiridina nucleótido) y el TPN (trifosfopiridina nucleótida) en el gato. George y Scaria (1958) investigaron los músculos pectorales y de las patas de las palomas, y observaron una relación entre la alta actividad oxidativa de las enzimas en el músculo rojo y la cantidad de mitocondrias.

La primera aplicación de los métodos enzimáticos en el músculo humano la realizaron Wachstein y Meisel en 1955 en material de autopsia, como en los estudios que realizaron con animales, observaron una variación en la actividad de la deshidrogenasa succínica en diferentes fibras. Dubowitz y Pearse (1960a,b) establecieron que hay una interrelación de la actividad de la fosforilasa y de varias enzimas oxidativas en las fibras musculares; además encontraron que tanto en humanos como en animales se presentaban dos tipos de fibras, las tipo 1 con alta oxidación y baja actividad glicolítica y el tipo 2 con baja oxidación y alta actividad glicolítica.

En el material de biopsia Engel en 1962 también menciona dos tipos de fibras, pero las relaciona con la actividad para ATPasa de las miofibrillas; las tipo de 1 tienen baja actividad de ATPasa y las de tipo 2 son de alta actividad.

Los autores que trabajaron con músculos de animales sugirieron un sistema complejo de clasificación. Stein y Padykula en 1962 reconocieron tres tipos de fibras (A, B, C) por su tamaño y su distribución mitocondrial con respecto a la reacción deshidrogenasa succínica. También Romanul en 1964 empleando una serie de reacciones histoquímicas definió 8 tipos de fibras en base a su actividad enzimática. Gauthier y Padykula (1966) estudiaron los tipos de fibras del diafragma en varios mamíferos con base en el contenido mitocondrial de las fibras, para lo cual utilizaron la técnica de Sudán negro para lípidos y el microscopio electrónico. Gauthier en 1966 y 1970 comparó el contenido mitocondrial usando SDH y ATPasa mitocondrial con los aspectos ultraestructurales del músculo semitendinoso de la rata, donde distinguió bandas rojas anteriores y bandas blancas posteriores. Ella distinguió tres tipos de fibras por el contenido mitocondrial rojas, blancas e intermedias. Las fibras rojas eran ricas en mitocondrias grandes y con crestas abundantes, tenían una ancha línea Z y abundante retículo sarcoplásmico en la región de la banda H. En las fibras blancas las mitocondrias son pequeñas y se encuentran en menor número y sus crestas son pocas, la banda Z tenía la mitad del espesor del de las fibras rojas. Las fibras intermedias resultaron ser similares a las fibras rojas con excepción del mayor diámetro que poseen; las mitocondrias son un poco más pequeñas y con crestas menos abundantes. La parte roja visible del músculo contiene predominantes fibras 'rojas' (52%), intermedias (40%) mientras que la parte microscópicamente blanca del músculo contenía (82%) de fibras blancas, (14%) de fibras intermedias y (4%) de fibras rojas. Estos datos se complementaron con estudios fisiológicos de Close (1967) que mostraron que el músculo extensor largo de los dedos de rata (EDL) se constituye solamente de unidades motoras rápidas mientras que el soleo se compone de unidades lentas con una proporción menor de (10%) de unidades intermedias.

Schiaffino y sus colaboradores concluyeron analizando todos los datos presentados, que las variaciones estructurales en las fibras musculares se relacionaban con dos diferentes aspectos fisiológicos: velocidad de contracción y resistencia a la fatiga. Abundantes mitocondrias y una banda Z ancha se relacionan con resistencia a fatiga, mientras la velocidad de contracción se asocia al desarrollo del retículo sarcoplásmico y no tiene relación con la abundancia mitocondrial ó grosor de la banda Z.

En el músculo humano, se pueden determinar 4 tipos de fibras: 1, 2A, 2B y 2C. Las fibras 2C son raras en el músculo normal, pues son precursoras que se diferencian en fibras 2A y 2B. Las fibras 1, 2A, y 2B son consideradas lentas y oxidativas, rápidas oxidativas glicolíticas y rápidas glicolíticas respectivamente.

Los antecedentes fueron tomados de Dubowitz 1973, Dubowitz 1985.

3. ORIGEN EMBRIOLOGICO

El músculo embriológicamente se forma de los somitas del mesodermo, cuando el embrión es de solo 2 ó 3 semanas (en estado de disco), y las masas celulares (somitas) se encuentran en ambos lados de la línea axial. Algunos de estos somitas llegan a formar los músculos lisos y varias estructuras mesenquimales. Otras partes de la porción media dorsal de los somitas, dan lugar a células musculares primitivas, que más adelante formarán las fibras musculares (Kakulas 1985).

Cuarta y Quinta semana

El desarrollo de los mioblastos es por agrupación metamérica, en forma de miotomas, 38 en total (3 occipitales, 8 cervicales, 12 torácicos, 15 lumbares, 5 sacros y 5 coccigeos). Los miotomas, se unen con las placas laterales de los dermatomas, en la 4 y 5 semana de vida fetal, formando los dermatomiotomas. Cada miotoma recibe un nervio espinal. Los miotomas son los primeros en arreglarse metaméricamente, a cada lado de la columna vertebral. Estos segmentos más adelante tienen un desarrollo dorsal con respecto de las vértebras y ventral con respecto al cuerpo. A excepción de los músculos intercostales y de otros pocos músculos el patrón de segmentación muscular es similar.

Los músculos esqueléticos están formados por los miotomas en tres vías: Por 1) proceso de fusión, 2) por partición en plano vertical, y tangencial, 3) por reorientación en la dirección, de las fibras.

Los miembros se forman por la fusión de 2 o más miotomas. Cada músculo es formado por su relación en el embrión, por lo que puede alterarse. Sin embargo en cada músculo se conserva la evidencia de su derivación metamérica.

Séptima y Novena semana.

Durante este período la fusión y la elongación de los miocitos, forman los miotúbulos primitivos. Un miotúbulo es una célula multinucleada con una hilera de núcleos centrales helicoidales que aparentan un tubo hueco con un borde delgado de citoplasma. Por la décima semana largas protofibrillas aparecen en la parte periférica de la fibra muscular.

En suma en estos, miotúbulos cada uno se rodea de una membrana basal, que se continúa formando por algún tiempo. Los miotúbulos más recientes serán siempre más pequeños que los que ya estaban formados. Los más anteriores se agrandan por incorporación de otros mioblastos indiferenciados.

La variación en el tamaño da la apariencia de una sección transversal del músculo fetal. Los filamentos de actina son los primeros en formarse y se agregan en fascículos pequeños, un poco después se formados filamentos gruesos de miosina por polirribosomas. Las primeras miofibrillas no son estriadas.

Los filamentos de actina y miosina se unen y forman las miofibrillas estriadas y en este proceso aparece inicialmente el sarcolema. Los túbulos transversos son presumiblemente, el primer signo del sistema T. Que aparecen en intervalos de 1 a 5 μm . La formación de las miofibrillas involucra la fusión de los Cuerpos Z, a los que, los filamentos de actina se ligan. El retículo sarcoplásmico se desarrolla después de los miofilamentos, y se organizan como miofibrillas no estriadas. Los núcleos musculares empiezan a migrar para asumir su posición característica.

Décima y décimoquinta semana

El músculo como tal se identifica a partir de la séptima semana, y parece terminar su formación hacia la décima semana. En un embrión de 11 semanas el diámetro muscular se ha incrementado y las miofibrillas son más abundantes. Las células que rellenan son más completas y se parecen a las de músculo desarrollado, la estriación transversal es evidente en el músculo de brazos y tronco. Durante la semana 13, las miofibrillas se vuelven más gruesas y oscuras, las miofibrillas forman columnas compactas. La formación de nuevos miotúbulos continúa, con el patrón de delgadas y gruesas. En la semana catorce, las miofibrillas continúan incrementándose en número y en tamaño y después se agrupan en distintos sacos. Dos tamaños de fibras se observan en la semana 15 y son unos más grandes que otros. Los grandes tienen muy poco sarcoplasma en el centro y las miofibrillas estriadas son más prominentes y el núcleo tienen una posición periférica. Las fibras pequeñas se encuentran dispersas entre las fibras grandes, tienen pocas miofibrillas y el sarcolema nuclear ocupa una posición central. A la semana 16, los núcleos musculares son más numerosos, elongados, y toman su posición bajo el sarcolema.

Décimosexta semana al nacimiento.

A partir de la semana 16 el músculo sigue creciendo, tanto en longitud como en grosor y las estriaciones siguen desarrollándose. No ocurren otros cambios histológicos. Solo que a diferencia de otras etapas de la vida donde se tiene una medida del diámetro muscular la etapa fetal no tiene uniformidad en este sentido.

El crecimiento de las fibras musculares en la segunda mitad de la vida intrauterina, se da principalmente por incremento individual en tamaño de cada fibra y no por el incremento en número de fibras. Esto ocurre por el resto de la etapa intrauterina hasta el nacimiento, así como en la infancia y algunos músculos siguen su desarrollo hasta la adolescencia.

4. ESTRUCTURA DEL MÚSCULO NORMAL

En este capítulo se describirá la composición del músculo normal; su apariencia y sus constituyentes histológicos. Las notas para este capítulo se tomaron de Rodin, 1977.

Es un tejido de movimiento, el cuál se encuentra unido a huesos y esta limitado por movimientos individuales, correspondientes a cada parte del cuerpo.

Por su estructura el músculo se puede dividir en dos clases:

- Músculo estriado
- Músculo liso

Y por su función se divide en:

- Músculo esquelético voluntario
- Músculo cardíaco involuntario
- Músculo liso involuntario

El músculo que nos ocupa en este trabajo es el estriado, que como se mencionó se encuentra cercano a la conformación ósea. Estas son fibras elongadas y con forma de huso; estas fibras se pueden enlazar a estructuras del tejido conectivo, como son los septos, trabéculas, fascias, tendones, periostio.

En el músculo esquelético cada fibra esta rodeada por tejido conectivo denso que lo envuelve completamente, llamado epimisio. El músculo se encuentra compuesto por fascículos, los cuales son paquetes de fibras musculares y cada fascículo se encuentra rodeado de una lámina de tejido conectivo perimisial. Los fascículos a su vez estan envueltos por una capa delicada de tejido conectivo llamado endomisio (fig 1).

Este arreglo compartimentalizado de tejido conectivo, facilita el proceso de contracción, por grupos o por fascículos; entonces la contracción puede ser independiente o simultánea.

El músculo presenta dos movimientos propios que son de acortamiento y de alargamiento ó relajación. El acortamiento de las fibras se conoce como contracción y se encuentra controlada por la presencia de filamentos de proteínas conocidas como actina y miosina (fig 2a).

La forma y tamaño de los músculos esqueléticos es muy variable, pero cada uno sigue un patrón muy similar que detallaremos mas adelante.

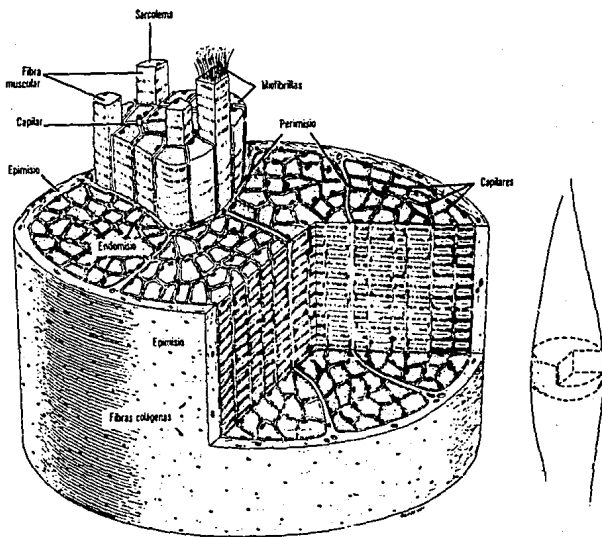


Fig. 1 Dibujo esquemático de la organización del músculo estriado esquelético. Derecha punto del cuál se retiró el segmento ilustrado. (Junqueira, 1981).

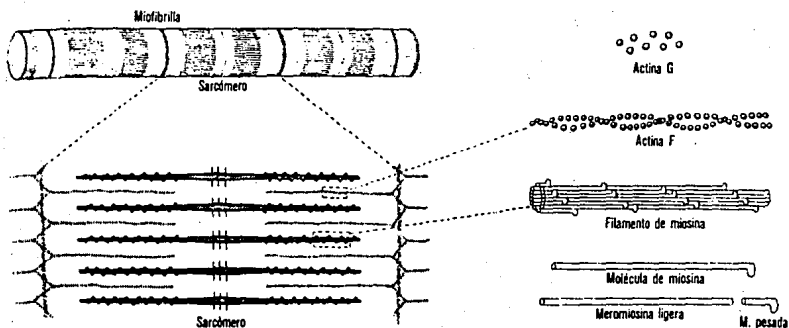


Fig. 2a. Disposición y estructura de los filamentos de actina y miosina, en el sarcómero. Izquierda, componentes del sarcómero. Derecha aspecto molecular de estos componentes. (Junqueira, 1981).

Como organización general el músculo observa las siguientes características:

Presenta fibras alargadas y cilíndricas, las cuales son multinucleadas en la periferia, tiene estriaciones transversales y terminaciones adelgazadas, las dimensiones varían de 1 a 40 mm de largo y de 10 a 100 μm de diámetro (Tabla I, II); que en un corte transversal presentan la forma redondeada o de polígono, cada una de estas fibras individuales se encuentran rodeadas de una membrana llamada sarcolema, la cual esta rodeada de núcleos aplanados, que tienen forma oval o heliética, que están localizados en posición periférica de la fibra, justo debajo del sarcolema.

El citoplasma extrafibrillar, contiene mitocondrias, depósitos de lípidos glucógeno y sistema reticular endoplásmico no granulado.

En el músculo se pueden reconocer otro tipo de estructuras como son:

Sarcolema

Es el término que originalmente se designó para membranas de aspecto de fibras elásticas duras, que rodean a la fibra muscular. El estudio con microscopía electrónica se observó, que esta membrana tiene una estructura consistente de una membrana celular, una lámina basal externa y una red delgada de fibrillas de colágena. También se conoce a la lámina externa y las fibras reticulares como endomisio y el término sarcolema se reserva para la membrana celular de las células musculares. La membrana del sarcolema es trilaminar de 90 A, la cual encierra ajustadamente al sarcoplasma. En algunas ocasiones se pueden observar invaginaciones microscópicas, que se extienden hacia el interior de la fibra, que forma los túbulos transversales o mejor conocidos como sistema T. El sistema T participa en el impulso de excitabilidad durante la contracción muscular, actúa como vía exterior del sarcolema, hacia el interior de la célula.

Sarcoplasma.

El espacio entre las miofibrillas y sarcolema interno se conoce como el citoplasma de la fibra, o el sarcoplasma. Este sarcoplasma contiene numerosos organelos, incluidos las mitocondrias, el retículo sarcoplásmico y el complejo de membranas del sistema T, microtúbulos, filamentos intermedios, aparato de Golgi, glucógeno, ribosomas libres, gotas de lípidos y lipofucsina. Los gránulos de glucógeno son de 15 a 30 nm de tamaño.

Tabla I

DIAMETRO DE FIBRAS DE TIPO 1 Y TIPO 2 EN EL MUSCULO VASTO LATERAL
DE UN GRUPO DE NIÑOS ENTRE LOS 0 Y 20 AÑOS.

Representación de valores media \pm desviación estándar

Grupos de edades (años)	Media de edades (años)	No. de Sujetos (H / M)	Músculo Vasto lateral		% de Fibras Tipo 1
			Diámetro de fibras (μ m)		
			Tipo 1	Tipo 2	
0 - 0.1	0.03 \pm 0.01	2 (2/-)	12.7 \pm 2.7	10.9 \pm 3.2	
0.1 - 0.5	0.3 \pm 0.1	14 (6/8)	12.9 \pm 1.9	11.8 \pm 1.8	40 \pm 9
0.5 - 1.5	1.0 \pm 0.3	17 (7/10)	17.1 \pm 2.3	16.6 \pm 2.6	53 \pm 8
1.5 - 3	2.3 \pm 0.6	6 (3/3)	25.6 \pm 6.1	21.5 \pm 3.6	53 \pm 7
3 - 6	4.7 \pm 0.9	12 (6/6)	33.4 \pm 6.4	27.6 \pm 5.5	56 \pm 8
6 - 10	7.5 \pm 1.0	12 (9/3)	38.5 \pm 3.8	33.9 \pm 3.2	54 \pm 8
10 - 15	12.4 \pm 1.6	13 (9/4)	48.5 \pm 6.3	45.4 \pm 7.7	47 \pm 9
15 - 20 M	17.5 \pm 1.3	19	60.5 \pm 6.4	53.8 \pm 8.3	43 \pm 9
15 - 20 H	17.5 \pm 1.0	18	60.6 \pm 9.0	61.0 \pm 9.8	41 \pm 10

H = Hombres
M = Mujeres

Oertel (1985)

Tabla II

Valor normal para músculos de adulto
media del diámetro y proporción de fibras.

	Tipo 1		Tipo 2A		Tipo 2B	
	H	M	H	M	H	M
Porcentaje del diámetro de las fibras (um)	61	53	69	52	62	42
Porcentaje de fibras en el total	36	39	24	29	40	32

H= Hombres
M= Mujeres

Engel, 1969

Miofibrillas

Son los mayores constituyentes de la fibra y ocupan el 85-90% de su volumen. Cada miofibrilla esta compuesta por un paquete de tamaño regular de miofilamentos.

En el humano podemos encontrar fibras rojas y blancas. Las fibras blancas son células largas y ricas en miofibrillas y pobres en mitocondrias, son numerosas en biceps. Las fibras rojas son células pequeñas con relativamente pocas miofibrillas, y numerosas mitocondrias pequeñas, que pueden reemplazar, la mioglobina, lo cual contribuye ampliamente en el color.

Al microscopio electrónico podemos observar que las miofibrillas tienen bandas alternadas oscuras (bandas A), y claras (bandas I), su arreglo esta colindante con las miofibrillas, resultando las estriaciones transversas. El espacio observado está ocupado por una zona menos densa conocida como la banda H. La parte que se encuentra entre las dos líneas Z se llama sarcómera. La proteína esencial del músculo es la actin-miosina, que es la combinación de las proteínas actina y miosina, que son los miofilamentos submicroscópicos de la miofibrilla.

Miofilamentos. Proteínas contráctiles.

En el músculo el mecanismo contráctil es una función básica que se realiza por la interacción de la actina y la miosina las cuales actúan bajo la influencia de la troponina y otras proteínas reguladoras. Estas proteínas son largas y dan la apariencia de bandas cruzadas o de estriaciones transversales por lo que se le denomina músculo estriado (fig 2b). Cada miofilamento contiene de 1000 a 2000 filamentos arreglados regularmente en dos categorías: Miofilamentos gruesos y miofilamentos delgados. Los miofilamentos gruesos están concentrados en la banda A y se encuentran formados por la miosina, su tamaño puede ser de 1.5 μ m de largo por 100 Å de espesor y se constituyen de meromiosina ligera, que son estructuras cortas, de cabeza globular. El arreglo de interdigitación de filamentos delgados y gruesos llega a ser mas obvio en cortes transversales, que se pueden observar bajo luz polarizada.

Bajo microscopía electrónica las proteínas de la miosina se observan como filamentos gruesos y largos que se arreglan en paralelo, además que se extienden longitudinalmente a través de las bandas A.

COMPONENTES NO MONTADOS DE LOS FILAMENTOS

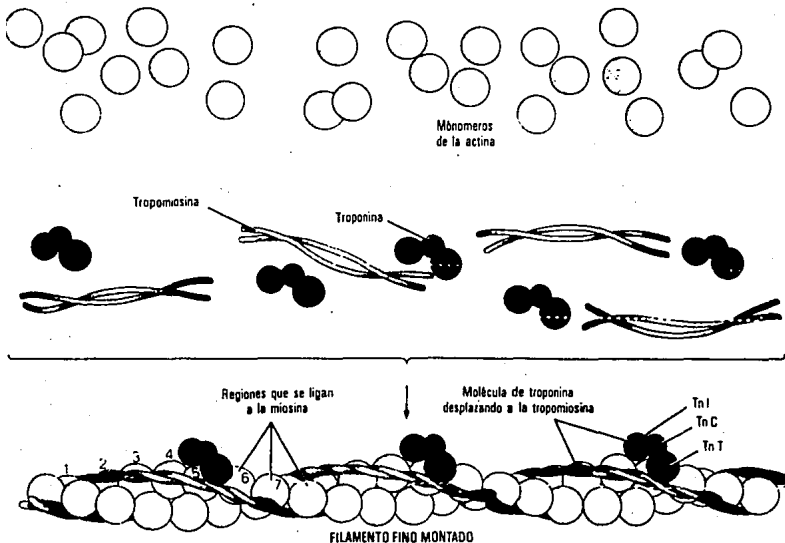


Fig. 26 Esquematación de la estructura del filamento fino del músculo. Parte superior componentes aislados, abajo integración de los mismos. Una molécula de troponosina, ocupa un surco correspondiente a siete moléculas de actina. Para cada molécula de tropomiosina existe una troponina compuesta de tres polipéptidos globulares. (Junqueira, 1981)

Se presenta una interdigitación de los filamentos gruesos con los filamentos delgados que contienen la actina y las proteínas reguladoras, que igualmente se arreglan en paralelo.

Los miofilamentos gruesos están arreglados en un patrón hexagonal, de aproximadamente 450 Å, con 6 filamentos de actina agrupados alrededor de cada filamento grueso. Cada filamento delgado se comparte con 3 filamentos gruesos.

Los filamentos de actina se encuentran unidos al disco Z que se localiza en la mitad de la banda I y que se extienden desde la línea Z a lo largo de la banda I hasta la banda A. En la parte media de la zona H hay una estriación adicional, la línea M causada por un ligero engrosamiento de los filamentos de miosina (fig 3). A fin de tener una definición de todas las bandas en microscopía, es necesario que el músculo se encuentre fijado y estirado. La porción extendida del músculo que se localiza entre dos líneas Z es llamada sarcómera y la fibra que se encuentra formada por varias sarcómeras se conoce como miofibrilla. Una sola fibra muscular está formada por algunos cientos de miofibrillas y cada miofibrilla está separada de otra por su espacio intermiofibrilar. En el espacio intermiofibrilar se encuentran varios organelos subcelulares como:

Las Mitocondrias

Son estructuras pequeñas, íntimamente relacionadas con suministro de energía a la fibra muscular. Se localizan fundamentalmente en el espacio miofibrilar a ambos lados de la línea Z y junto a la banda A (fig 4). Su estructura compleja es característica, ya que se encuentra rodeada de una sola membrana y en el interior del cuerpo se localiza una membrana con pliegues profundos en la cavidad central del organelo. La porción central de la mitocondria es material amorfo en el que ocasionalmente hay cuerpos densos.

Pueden ser numerosas cerca de los núcleos y en la zona limitada bajo del sarcolema y en los polos del núcleo. Las de las zonas cercanas al aparato de Golgi pueden ser pequeñas.

Sistema Tubular Transverso y Retículo Sarcoplásmico.

Estas estructuras se relacionan con la activación de la contracción, seguidas de un estímulo eléctrico en el músculo. El sistema T (Sistema tubular transverso) está en sentido transverso en el músculo haciendo contacto con algunas miofibrillas. Esta estructura está limitada por una membrana que se continúa con el sarcolema externo.

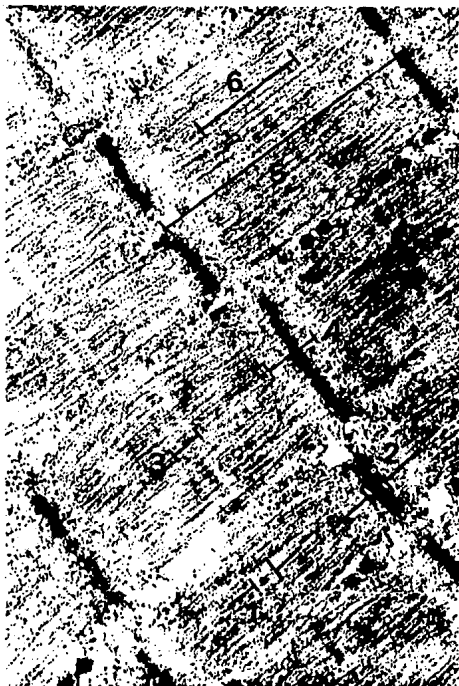


Fig. 3 Músculo esquelético normal. Corte longitudinal M:E: 36 995x. 1. Banda M. 2 línea Z. 3 banda I. 4 banda A. 5 sarcomera. 6 banda H. Acetato de uranio / citrato de plomo.



Fig. 4 Músculo esquelético normal. Corte longitudinal M. E. 35 347x. 1 mitocondrias. 2 línea Z. 3 glucógeno. Acetato de uranilo / citrato de plomo.



Fig. 5 Corte longitudinal de músculo esquelético normal M. E. 28 529x. 1. línea Z. 2. elementos tubulares del sistema retículo sarcoplásmico. Acetato de uranilo /citrato de Plomo.

En los humanos el sistema T se localiza cercano a la unión de la banda A y la banda I (fig 5).

El retículo sarcoplásmico es una estructura discontinua que forma una saco fenestrado alrededor de la miofibrilla individual. Con microscopía electrónica se observa el interior del retículo, lleno de material amorfo. A causa de una pequeña expansión sacular del retículo sarcoplásmico, cuando se encuentra adosado al sistema T, se observa un arreglo regular y repetido de las dos estructuras, conocido como tríada, que en el humano se encuentra en unión con la banda A y la banda I.

Gránulos de glucógeno.

Se pueden observar claramente en el músculo con microscopía electrónica y se caracterizan por su tamaño (150 a 300A) y por presentarse diferencialmente en la fibra muscular, pero hay una tendencia a encontrarse en mayor número en la zona de la banda I que en la zona de la banda A (fig 6).

Otras estructuras que se pueden apreciar en una biopsia de músculo son:

Husos neuromusculares

Son estructuras especializadas con fibras estriadas y con una cápsula de tejido conectivo, donde el número de fibras varía de 4 a 16. Los husos se localizan en los fascículos musculares en el tejido conectivo perimisial, cerca de los nervios y vasos (fig 7). Las fibras musculares intrafusales tienen su nervio motor especializado propio, así como sus nervios sensores. El huso neuromuscular actúa como un órgano sensorial, el cual se asocia a la coordinación de la actividad muscular, además de que mantiene el tono muscular. Estos husos pueden ser de dos tipos:

Los llamados bolsas de núcleos y que presentan una gran cantidad de núcleos en el área central de la fibra. Aquellos conocidos como cadenas de núcleos pequeños que se extienden por toda la fibra (fig. 8).

La actividad enzimática varía en las fibras intrafusales mucho más que en las fibras extrafusales.

En una biopsia de músculo es importante no confundir a las fibras intrafusales y a los husos musculares con las fibras extrafusales.



Fig. 6 Corte transversal de músculo esquelético normal, M. E. 36 995x. 1 miofilamentos. 2 mitocondrias. 3. partículas de glucógeno. Acetato de uranilo / citrato de plomo.



Fig. 7 Vista de músculo normal, demostrando fascículos individuales, que forman el músculo mismo, también se observa un huso neuromuscular con sus fibras intrafasciales (flecha). H-E 200x.



Fig. 8. Corte longitudinal mostrando núcleos en cadena, dentro de la fibra muscular. H-E 800x.

Tejido Conectivo

El endomisio es una lámina delgada de tejido conectivo, alrededor de la fibra muscular, que consiste de una lámina basal externa, que pierde el arreglo reticular y una capa delgada de fibrillas de colágena. Ocasionalmente los mioblastos, están presentes, se conocen como células satélites, es raro encontrarlos en el músculo de adultos. Cuando están presentes se encuentran cerca del endomisio y se localizan conectados entre células satélites de la membrana y el sarcolema. Estas células son indiferenciadas, probablemente son mioblastos, pero definitivamente no representan a los fibroblastos.

El perimisio rodea a un grupo de células musculares referidas como fascículos. Este engrosamiento del perimisio contiene paquetes de fibrillas de colágeno y algunas fibras elásticas, así como ocasionales fibroblastos.

La conexión del músculo al tendón es por la unión miotendinosa, una delgada capa de fibras reticulares y miofibrillas elásticas se interponen entre el sarcolema, el grueso de fibras colágenas y el tendón.

En el espacio intercelular de tejido conectivo y el endomisio se encuentran pequeños nervios y una red de capilares sanguíneos. Se encuentran presentes venulas y arteriolas en el perimisio, las cuales acarrean a las células pilares y a macrófagos.

Vasos Sanguíneos.

Los músculos son extremadamente ricos en irrigación sanguínea principalmente de capilares, los cuales se encuentran encerrados por sarcolema, los capilares corren longitudinalmente entre las fibras musculares, frecuentemente son anastomosados, cortos y transversales, originando una red capilar estrecha de malla oblongada. El endotelio capilar es delgado y de tipo continuo en el que se encuentran numerosas vesículas picnocíticas. Los pericitos se encuentran encerrados en la superficie externa de las células entodeliales. Los capilares linfáticos y los vasos no están presentes en el endomisio, pero se encuentran en el epimisio y el perimisio

El sistema vascular es evidenciado tanto en tinciones de rutina, como en reacciones histoquímicas. Con ATPasa por ejemplo se observan las arteriolas de tamaño medio y las venas que corren entre los fascículos, mientras que dentro de estos, la red capilar se encuentra estrictamente relacionada con las fibras individuales. Las fibras de tipo 1 presentarán más capilares que las fibras del tipo 2.

Nervios Terminales.

La contracción del músculo esquelético y la coordinación de la actividad muscular, está regida por 2 terminales nerviosas, la terminal motora y la sensitiva.

La primera está representada por las placas terminales y las segundas son las terminales de nervios sensitivos, mejor conocidas como husos neuromusculares y terminaciones neurotendinosas. Cada célula del músculo esquelético está provista por una placa motora terminal, que consiste de un axón terminal bifurcado que se encuentra en la superficie de la fibra muscular. Los impulsos de los nervios eferentes llegan al sarcolema en la placa terminal, iniciando la contracción muscular. Desde el punto de vista funcional, el músculo está compuesto por unidades motoras, y cada una contiene una célula nerviosa motora, que conecta a los grupos de células musculares, con los axones. Así varias fibras musculares se encuentran inervadas por la misma fibra nerviosa, resultando la contracción de movimientos gruesos. Mientras que los movimientos finos son los que se producen por los músculos que se encuentran inervados por neuronas motoras solamente por una o varias fibras nerviosas.

Los nervios sensitivos aferentes se conectan al huso del músculo, y la contracción de estos músculos es estimulada por los nervios terminales. La función principal de los husos neuromusculares es el control de la contracción muscular por vía subsecuente del arco reflejo monosináptico.

Los axones presinápticos contienen numerosas vesículas sinápticas y organelos, en particular mitocondrias. Alteraciones en axones y en uniones neuromusculares ocurren en una variedad de enfermedades, pero estas pueden ser no específicas.

Las terminales neurotendinosas se localizan en el tendón, cercanas a la unión miotendinosa. El nervio terminal es estimulado por estrechamiento o pulsación del tendón. El impulso del nervio aferente inhibe el impulso extremo de tensión en la contracción del músculo, por vía del arco reflejo disináptico.

En las figuras 9 a la 13 observamos el aspecto del músculo normal con las diferentes técnicas histológicas e histoquímicas, que se emplearon en este trabajo.



Fig. 9 Fotomicrografía de músculo normal, en corte trasversal, con las fibras musculares en color rosa, y los núcleos periféricos en color morado. Se observa uniformidad en tamaño y forma. H-E 800 x.



Fig. 10 Músculo normal teñido con la técnica de tricrómico de Gomori modificado, donde las fibras se observan en color verde turquesa y los núcleos en color rojo. Corte transversal. 300 x.

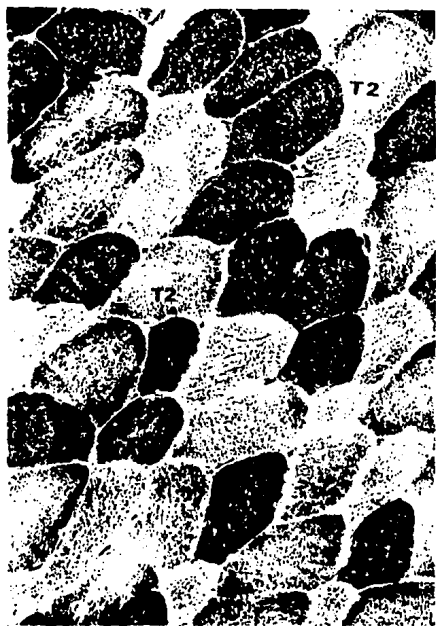


Fig. 11 Músculo normal teñido con la técnica histoquímica de NADH-TR, donde se observa claramente el patrón de la red intemiofibrillar, que se extiende en las fibras musculares en forma ordenada. Las fibras de tipo 1 se encuentran en color oscuro y las fibras de tipo 2 en color claro. 800x.

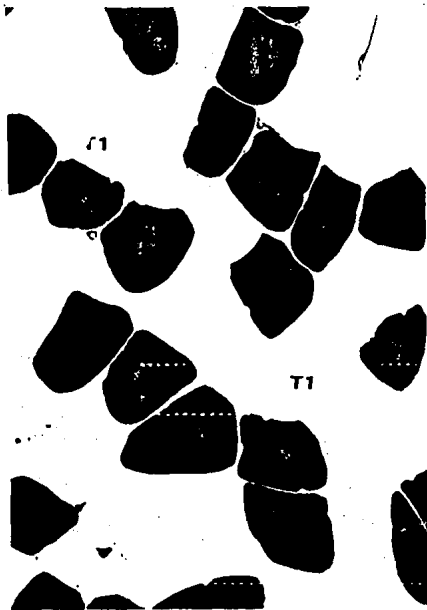


Fig. 12 Músculo normal con la técnica histoquímica de ATPasa pH. 9.4 donde las fibras de tipo 1 son de color claro y las fibra de tipo 2 de color oscuro. Corte trasversal. 800x.



Fig. 13 Músculo normal, en corte trasversal, con la técnica histoquímica ATPasa pH 4.6. Las fibras de tipo 1, se encuentran en color oscuro, las fibras de tipo 2A, en color claro y las fibras 2B en color intermedio. 800x.

5. OBJETIVOS

En base a la gran cantidad de pacientes que cursan con enfermedades de tipo miopatico, y en los cuales el estudio histopatológico es hasta el momento poco accesible, se plantearon los siguientes objetivos.

1. Realizar tecnicas histológica e histoquimicas para identificar cambios estructurales en las fibras musculares de pacientes, con diagnóstico clínico de miopatía.
2. Hacer estudios de microscopía electrónica para establecer cambios de las fibras musculares a nivel ultraestructural, que permitan completar el diagnóstico de la enfermedad.
3. Establecer por lo tanto la relación entre de los hallazgos morfologicos y el diagnóstico clínico.

5.1 METODOS HISTOQUIMICOS

a) Técnicas histoquímicas

Dentro de los metodos de rutina para biopsia de músculo 2 de las más empleadas son: hematoxilina-eosina (H-E), y el tricrómico modificado de Gomori.

Estás técnicas nos dan un panorama claro de la morfología de las fibras musculares, tanto de los elementos estructurales, así como de los nervios, vasos sanguíneos y estructuras anormales de las células musculares.

Con la técnica de H-E observamos que el núcleo sarcolémico se tiñe en azul, las fibras musculares en rosa y el tejido conectivo en rosa pálido. Las fibras basofílicas se reconocen por su coloración en azul.

Con el tricrómico de Gomori modificado las fibras musculares se tiñen en azul verdoso y el colágeno es de color turquesa, los núcleos se tiñen en rojo y los axones son azulados. Las mitocondrias de que se encuentran aumentadas en diferentes enfermedades las fibras pueden presentar un aspecto de tinción en rojo oscuro, como en el caso de las "ragged red fibres", o fibras rojas rasgadas. Otras técnicas que pueden emplearse son el Sudán B negro o el rojo oleoso para lípidos; para ácidos nucleicos, violeta rápido; para material metacromático y para estructuras como cuerpos nemalínicos se utiliza la hematoxilina fosfotúngstica (PTAH). Para axones terminales se utiliza azul de metileno. Las técnicas de argento-aurícas pueden ser empleadas de igual manera (Dubowitz 1973).

b) Reacciones histoquímicas

Se consideran importantes por las siguientes causas (Dubowitz 1973):

1.- Facilitan la demostración de los tipos de fibras específicas por medio de reacciones enzimáticas, y por lo tanto el tipo de fibra que se encuentra involucrado en la enfermedad (fig. 14).

2.- Demuestran la falta de una enzima en particular como la fosforilasa en enfermedad de Mc Ardle, además de la deficiencia o exceso de un producto de almacenamiento.

REACCION GENERAL DE LA SECUENCIA EN LA
TECNICA ENZIMATICA



Fig. 14

3.- Permite observar cambios en la estructura muscular que no se aprecian con otras técnicas histológicas como son los corazones centrales, y fibras apolilladas entre otras (fig 15)

Las enzimas oxidativas (Deshidrogenasas, diaforasas, oxidasas).

Son algunas enzimas oxidativas intermediarias que participan en el ciclo de Krebs e indican un recurso energético posible, en el metabolismo del músculo. Las deshidrogenasas son enzimas oxidativas que transfieren electrones del sustrato al aceptor, con excepción de la deshidrogenasa succínica y la deshidrogenasa alfa-glicerofosfatasa mitocondrial, que necesitan de una coenzima para reaccionar.

El principio de reacción de estas técnicas histoquímicas es el de emplear una sal de tetrazolium, la cuál es incolora y soluble pero que cuando intercepta electrones en un punto de la cadena respiratoria se reduce a formazán dando un color negro que se deposita en el sitio de reacción. Los compuestos más usados son el nitroblue tetrazolium NBT, el cloruro de ditetrazolium y el 2,5 difenil bromuro de tetrazolium y el MTT (Wilson 1984).

Diaforasas

La enzima clásica es la NADH-Tetrazolium reductasa que usa el NADH como sustrato y el compuesto de tetrazolium como aceptor de electrones. Para esta técnica el tejido se incuba en una solución de NADH y NBT o MTT; el músculo incorpora el NADH-Tetrazolium reductasa y libera el hidrógeno del NADH y el tetrazolium se reducirá a formazán insoluble y se deposita cerca del sitio de la reacción (Wilson 1984).

Deshidrogenasas unión-coenzima

Generalmente se utilizan para demostrar las deshidrogenasas dependientes de NAD o NADP. Un ejemplo es la oxidación del lactato a piruvato por medio de la deshidrogenasa láctica, en donde la reacción se completa con la reducción de NAD a NADH y este último pueda ser oxidado por el NADH-Tetrazolium reductasa en el tejido y se pueda unir al NBT. El NADH se produce a partir de NAD por acción enzimática, mientras que en la demostración del NADH + TR se añade al medio de incubación original (fig 16).

Deshidrogenasas que no se unen a coenzimas.

Algunas deshidrogenasas pueden transferir electrones directamente al sistema citocromo, con la mediación de coenzimas, como la deshidrogenasa succínica. En las reacciones oxidativas se promueve la oxidación del succinato a fumarato, donde la enzima no puede transferir electrones al tetrazolium, sin que intervenga el desencadenamiento del citocromo. Reacciones parecidas a las succinoxidasas implican que enzimas como la deshidrogenasa succínica se encuentren involucradas.

Para la adición de aceptores de electrones se emplea la fenacina-metasulfato, la cual se puede reducir con la deshidrogenasa succínica directamente, además que se puede utilizar para reducir el tetrazolium a formazán. En esta técnica se demuestra la actividad y la localización de la deshidrogenasa succínica.

El menadione (vitamina K) se utiliza en la histoquímica y actúa como aceptor de electrones (Watenberg y Leong 1960), generalmente en las reacciones de alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, y para demostrar la alfa-glicerofosfatasa deshidrogenasa mitocondrial, que es correspondiente de coenzima en lo que difiere del glicerofosfato deshidrogenasa unida al NADH en el citoplasma (Wilson 1984).

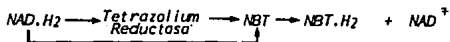
Problemas de interpretación

Uno de los factores que deben tomarse en cuenta en estos métodos cuando se determina la oxidación de enzimas es que los compuestos de tetrazolium NBT y MTT tiene una gran afinidad por algunas membranas fosfolípídicas del tejido muscular, reaccionando directamente con las mitocondrias y el retículo sarcoplásmico. Por eso cuando se coloca una sección del músculo en una solución que contenga tetrazolium y se reduzca con sulfuro de amonio se dará una reducción directa y esto podrá dar un falso positivo.

Otra situación diferente se presenta cuando se usa menadione y NBT para demostrar una reacción histoquímica. Porque el menadione se reduce directamente a pH 7.0 por algunos tejidos que contienen grupos sulfhidrilo, esto provoca que con la adición de la enzima, los grupos sulfhidrilo se puedan demostrar, dando un factor de localización falso y el error puede deberse a la interpretación de la tinción.

Las dificultades mencionadas reducen la información de las reacciones bioquímicas e histoquímicas, lo cual puede deberse en gran parte a la falta de práctica en la interpretación de biopsias musculares .

TRANSFERENCIA DE HIDROGENOS EN LA REACCION DE
TETRAZOLIUM REDUCTASA

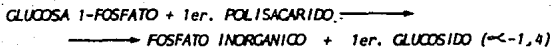


*Transferencia directa - no enzimática
Doble paso de hidrogenos en el sistema
de diaforasas.*

Sida (1993)

Fig. 16

REACCION BIOQUIMICA DE LA FOSFORILASA



Sida (1993)

Fig. 17

Fosforilasas

Son enzimas citoplasmáticas que, se encuentran in vivo involucradas en la degradación de glucógeno, por el rompimiento de la unión 1,4 glucosídica. In vitro la reacción se hace reversible del glucógeno a glucosa 1-fosfato.

La técnica depende de la síntesis de polisacáridos en forma de glucosa alfa 1-fosfato (fig 17).

La extensión de una ramificación desencadena la formación proporcional de la actividad de la fosforilasa presente. Cuando la tinción se da por yodo el color varía de acuerdo al desencadenamiento. Una reacción amarilla es negativa, y va a cambiar la positividad conforme al color se modifica hacia el tono café (Wilson, 1984).

Adenosin Trifosfatasa (ATPasa)

En el proceso histoquímico depende de una serie de reacciones complejas para llegar al producto final, en la que el tejido tendrá que incubarse en una solución que contenga ATP y calcio y que se encuentre a pH 9.4. En la reacción la enzima ATPasa separa el fosfato terminal del ATP con participación del calcio presente; el fosfato se va a combinar rápidamente con el calcio para formar fosfato de calcio. En pH alcalino el fosfato de calcio es insoluble y se deposita en el sitio de la actividad enzimática. El tejido será transferido a una solución de cloruro de cobalto, en donde se dará un intercambio del ión cobalto por el ión calcio, para formar fosfato de cobalto, en los sitios de actividad. El siguiente cambio del tejido será a una solución de sulfuro de amonio, dando como resultado el color negro correspondiente al sulfuro de cobalto insoluble (fig 18).

Cuando el músculo se seca al aire y se expone al calcio, la red intermiofibrilar se altera y durante la reacción se desintegra por lo que la ATPasa no muestra su ubicación y se restringe a la miosina. Esta enzima evidencia varios tipos de fibras que son dependientes del pH (Wilson 1984).

Tinción por Acido Periódico de Schiff (PAS)

Nos señala la presencia de glucógeno en músculo y de otros polisacáridos, algunos mucopolisacáridos, mucos y glicoproteínas glicolípidos y algunos lípidos insaturados. La tinción normalmente depende de la oxidación del grupo 1,2 glicol por acción del ácido periódico, de donde resulta la formación de los dialdehídos que reaccionan con el reactivo de Schiff (fucsina sulfurosa ácida) que producen una tinción rojo-púrpura

SECUENCIA DE LA TECNICA DE ATPasa Ca⁺⁺

REACCION ENZIMA _ SUSTRATO

1. $ATP + H_2O \xrightarrow{\text{enzima}} ADP + H_3PO_4$
2. $HPO_4^{--} + HOH \rightarrow H^+ + PO_4^{---} \rightarrow H_3O^+ + (PO_4)^{---}$

REACCION DE CAPTURA

3. $3Ca^{++} + 2(PO_4)^{---} \rightarrow Ca_3(PO_4)_2$

REACCIONES DE DESARROLLO DEL COLOR

4. $3CaCl_2 + Ca(PO_4)_2 \rightarrow 3CaCl_2 + Ca(PO_4)_2 \downarrow$
5. $Ca_3(PO_4)_2 + 3H_2S \rightarrow 3CaS \downarrow + 2H_3PO_4$

Sida (1993)

Fig. 18

5.2 LA BIOPSIA MUSCULAR

El estudio de las biopsias de músculo es una técnica complementaria en el estudio de clasificación y diagnóstico de enfermedades neuromusculares, miopatías primarias, lesiones inflamatorias y distrofias musculares.

Para practicar una biopsia muscular es necesario:

1. Selección del paciente

El criterio básico es que el paciente presente alguna evidencia de tener una enfermedad neuromuscular, que se manifiesta generalmente como debilidad muscular.

Para hacer la selección del músculo que va a ser biopsiado, es necesario conocer la distribución de los músculos débiles, ya que estos presentarán marcadores morfológicos de la enfermedad. Cuando la distribución de la debilidad es proximal, se selecciona un músculo de esa área, como puede ser el cuádriceps o bien el bíceps; el deltoides y el gastrocnemio son también músculos favorables para hacer la toma de biopsia. Estos músculos presentan la ventaja de tener un patrón histológico familiar y la distribución de los tipos y tamaños de las fibras es más fácil de reconocer (Dubowitz, 1985).

Otros músculos están en desventaja para la biopsia por tener un patrón de distribución diferente, para el cuál tendría que hacerse un seguimiento particular de investigación.

2. Técnica para tomar la biopsia

Se puede realizar igualmente en adultos como en niños, bajo anestesia local, ya que ésta no presenta complicaciones, que pudieran darse bajo anestesia general, como podrían ser las dificultades respiratorias en pacientes con enfermedades neuromusculares.

Para tomar la biopsia es necesario inyectar la piel con Xilocaína al 2 % evitando inyectar el músculo. Se procede a hacer una incisión de 3 a 4 cm. de longitud, en dirección de las fibras musculares. La piel se retrae y se expone la fascia muscular. El músculo se remueve y se sujeta con unas pinzas y se procede a aislar un cilindro muscular de 2.5cm de longitud por 0.5cm de ancho, el cuál se sujeta con hilo de sutura.

El músculo se extiende sobre una gasa humedecida en solución fisiológica fría, y se conserva la orientación de las fibras, y se cortar el músculo, pero manteniéndolo extendido.

Para microscopía electrónica es importante que el músculo permanezca extendido, por lo que en ocasiones se emplea un sujetador que realiza esta función (Dubowitz 1985).

Para procesos histoquímicos no es indispensable que el músculo se mantenga extendido.

La relajación del músculo es importante para la cuestión cuantitativa, ya que cuando no se presenta este proceso, de forma natural, como sucede después de la biopsia, por que se ha ejercido, un estiramiento mecánico por sujetar el músculo se produce alteración en el diámetro de las fibras, esto también se observa cuando el músculo se ha congelado previamente. Hay técnicas, como la empleada en este trabajo, que permiten el relajamiento natural del músculo, al colocarlo en gasa húmeda en solución fisiológica a 5 C durante 30 minutos.

Terminada la biopsia, la fascia se sutura con material absorbible para evitar la herniación del músculo y se cierra la piel. Después de 24 horas se pueden presentar sensaciones de puncción en el sitio de la biopsia.

Algunos autores emplean la biopsia con agujas percutáneas por su facilidad de uso y rapidez en pacientes externos y principalmente en niños. Pero presenta algunas limitaciones, como el tamaño de la muestra donde no se aprecia la orientación de la misma.

Para preparar el espécimen para estudios histológicos o histoquímicos, el material debe congelarse lo más pronto posible para evitar que las enzimas solubles se inactiven. El lapso entre la toma de la biopsia y el congelamiento de la muestra puede esperar 30 minutos sin que se presenten cambios importantes. Para la congelación se propone usar nitrógeno líquido (-160 C) no en forma directa por que se forman cristales por el congelamiento rápido (fig 19). Algunos autores emplean isopentano para la congelación ya que este compuesto actúa como un medio conductor dando un congelamiento más rápido. El isopentano se debe enfriar en nitrógeno líquido para que adquiera una consistencia de jarabe y cuando se introduzca el espécimen por pocos segundos se de un buen congelamiento. Otros autores (Dubowitz y Brook) proponen el método de goma de tragacanto-isopentano, donde el espécimen se incluye en goma de tragacanto al 10% directamente en una platina del microtomo. Este método se combina con el de isopentano antes descrito y el espécimen se guarda en el criostato para que sea cortado.

Estos métodos tienen el inconveniente de que son caros y que el isopentano se evapora rápidamente. Lo que quede del bloque se puede guardar en un recipiente que contenga nitrógeno líquido y se puede conservar por años sin que aparentemente pierda su actividad histoquímica.

En este trabajo se desarrolló la metodología desarrollada por Sida, 1991. Que consiste de cubrir el fragmento de músculo que se va a congelar, con talco perfectamente, y colocarlo en una platina fría que tenga medio de montaje para congelación (Tissue Tek). Se coloca el músculo en la platina y se cubre totalmente con Tissue Tek y se introduce en el nitrógeno líquido hasta que la muestra alcance la temperatura del nitrógeno.

Para realizar los cortes se usa un criostato en un intervalo de temperatura de -15 C hasta -25 C. Para especímenes con grasa una temperatura más baja facilita el corte. Los cortes serán de 10 μ de espesor o menos y se recogerán en un cubreobjetos para procesarlos en serie.

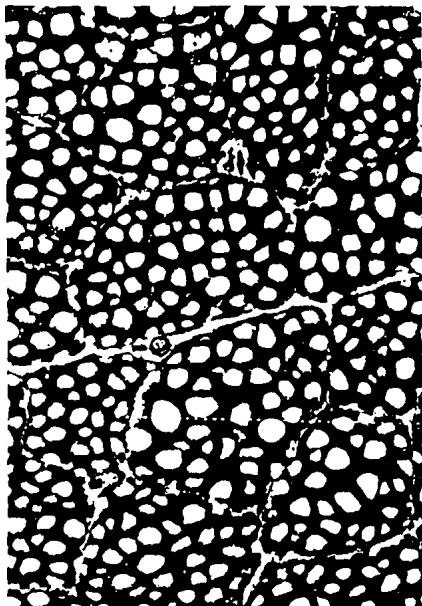


Fig. 19 Artefactos de hielo producidos en la fibra muscular, por una mala congelación. H-E 800x.

5.3 CITOARQUITECTURA E HISTOQUIMICA DEL MUSCULO

Se explicarán los detalles citoarquitectonicos del músculo normal que es tratado con técnicas histoquímicas.

Reacciones con Adenosin Trifosfatasa (ATPasa)

Para hacer la estimación es necesario recordar que incluye la preincubación del tejido en pH ácido y la incubación en ATPasa a pH 9.4 y la reacción se da a nivel de las miofibrillas ya que la red intermiofibrilar se ha destruido antes de la reacción. Por eso se presenta el aspecto de separación entre las miofibrillas. En las tinciones de cortes longitudinales se puede observar la zona de la banda A que contiene a la miosina. Esta reacción se conoce como la reacción de ATPasa de la miosina. La reacción de la técnica de ATPasa se puede variar cambiando las condiciones de la preincubación, lo que implica cambiar los valores del pH (Dubowitz 1973).

Preincubación a pH 4.3.

Se sugirió originalmente se hiciera con ácido etilendíamino tetraacético (EDTA) a pH 4.3 (Dubowitz y Brooke, 1973), con el cual el patrón normal de la reacción es alterada notoriamente provocando que las fibras de tipo 1 se oscurezcan y las tipo 2 no alcancen el tono normal de tinción quedando más claras que las de tipo 1. Sin embargo se demostró que el EDTA no era el que estaba influyendo en el cambio de coloración sino el pH era el que provocaba tal efecto y se podía realizar la preincubación sin EDTA.

Por ejemplo, se puede preincubar con buffer de Acetato de Sodio a pH 4.3 por 5 minutos observandose el mismo efecto. Raras fibras muestran un grado moderado de reactividad y constituyen fibras de tipo 2C.

Preincubación a pH 4.6.

Después de 5 minutos en preincubación a pH 4.6 se da una reacción diferente, en que las fibras tipo 1 tienen una reacción fuerte, y las del tipo 2 observaron una gran inhibición; presentandose así dos colores diferentes: las 2A que son completamente inhibidas y las 2B que tenían un grado de inhibición menor que las 2A.

Este tipo de inhibición se presenta en la actividad de la ATPasa en pH's alcalinos, por lo que en la técnica de ATPasa cada fibra presenta una sensibilidad propia en un intervalo específico de pH. En un análisis histográfico de fibras tipo 2 se encontró que las tipo 1, 2A y 2B presentaban aproximadamente la misma proporción de fibras.

Enzimas oxidativas.

Pueden presentar una apariencia similar en las reacciones, con punto de menor variación.

NADH-Tetrazolium Reductasa (NADH-TR)

Los dos tipos de fibras conocidas se pueden diferenciar unas de otras . El tipo 1 es de color más oscuro que el tipo 2. Las miofibrillas no se tiñen, pero sí la red intermiofibrilar que incluye a las mitocondrias y al retículo sarcoplásmico. El patrón de la red es un poco distinto en los dos tipos de fibra.

Con la correlación que hay en una reacción De NADH-TR y la actividad de la ATPasa pH 9.4, el músculo humano , muestra que las fibras de tipo 1 reaccionan más intensamente en NADH-TR que en ATPasa, y las fibras de tipo 2B tienen menor reacción con NADH-TR y el tipo 2A muestra una actividad intermedia en esta reacción (Dubowitz, 1973) (Tabla III).

Tabla III

*Resultados obtenidos en las fibras musculares
con las diferentes técnicas histoquímicas.*

<i>Técnica</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2 A</i>	<i>Tipo 2 B</i>
<i>ATP asa 9.4</i>	<i>Claras</i>	<i>Oscuras</i>	<i>Oscuras</i>
<i>ATP asa 4.6*</i>	<i>Oscuras</i>	<i>Claras</i>	<i>Oscuras</i>
<i>ATP asa 4.3*</i>	<i>Oscuras</i>	<i>Claras</i>	<i>Claras</i>
<i>NADH - TR</i>	<i>Oscuras</i>	<i>Claras</i>	<i>Claras</i>

** Preincubación*

Sida (1993)

5.4 CAMBIOS PATOLOGICOS DE LA BIOPSIA MUSCULAR

Mencionaremos los cambios patológicos que se pueden presentar en una biopsia muscular.

Las anomalías que se observan con mayor frecuencia son:

- 1.- Cambios en el tamaño de la fibra
- 2.- Distribución anormal de las fibras
- 3.- Cambios en el núcleo
- 4.- Degeneración y regeneración
- 5.- Cambios en la arquitectura

Dos de las características que afectan a las fibras del músculo son la hipertrofia y la atrofia, las cuales se reflejan en el aumento del volumen muscular generado por el trabajo repetido y sostenido y la pérdida de volumen por falta de actividad respectivamente.

Los cambios en el tamaño de las fibras pueden ser fisiológicos o patológicos. En las miopatías, la distribución de las fibras grandes y pequeñas es al azar, mientras que en las neuropatías las fibras atroficas por denervación se agrupan.

Es posible tener un panorama del tamaño de las fibras con la observación al microscopio, pero para tener un idea real es necesario medir el diámetro de cada fibra con la ayuda de un ocular micrométrico y realizar un histograma con los resultados obtenidos, para hacer una comparación con los parámetros normales de acuerdo a la edad y al sexo (Dubowitz 1973).

Atrofia • hipertrofia

En las atrofias las fibras pequeñas son más obvias en comparación a las grandes y en el histograma observamos que la campana de distribución aparece con el lado izquierdo más prominente, llegando a marcar un doble pico.

Este tipo de distribución se conoce como, una distribución de picos gemelos.

En la hipertrofia ocurre algo parecido, solo que la curva de distribución normal tendrá un cambio hacia la derecha.

Dubowitz (1972) encontró que tanto las fibras de tipo 1, como las de tipo 2 podían presentar atrofia, y que además podían encontrarse también en los subtipos 2A y 2B. Observó además que los tipos específicos para hipertrofia se presentaban con menor frecuencia, pero cuando se encontraban afectadas las fibras de tipo 2 se asociaban a un exceso de trabajo del músculo y se puede presentar tanto en hombres como en mujeres.

La atrofia de fibras de tipo 1 se presenta en forma poco frecuente; cuando se presenta con mayor intensidad se puede asociar con distrofia miotónica, artritis reumatoide o en algunas enfermedades infantiles como la miopatía tubular, miopatía nemalínica o una desproporción congénita del tipo de fibra.

La atrofia de fibras del tipo 2, que resulta del desuso muscular sea cual fuere la causa se asocia con anomalías como ocurre en enfermedades del tracto piramidal, retardo mental (Broke y Engel 1969), enfermedades de la colágena, (Engel 1965), miastenia gravis, polimialgia reumática o en la enfermedad de Parkinson.

Cuando se incrementa el tamaño de las fibras se observa que la distribución de su diámetro dentro de la curva es más amplia a pesar de que los valores de diámetro medio pueden caer dentro de los límites normales. Este cambio es propio de las miopatías, las cuales se diferencian de las denervaciones donde se presenta generalmente un histograma de picos gemelos.

La distribución de anomalías que se presentan en las biopsias donde los cambios patológicos no son muy evidentes pueden ser más notorios en una zona que en otra, por lo que se aconseja tomar al músculo como un conjunto y no como fibras individuales.

Cuando las atrofiadas se presentan en grupos de fibras pequeñas, como en las denervaciones se observa que generalmente se encuentran rodeadas de fibras de tamaño normal.

Para localizar a los grupos de fibras que se encuentran en zonas extensas del músculo, como son los fascículos, las fibras atroficas se encuentran generalmente separadas entre sí por efecto mismo de la enfermedad y puede darse el caso de que los grupos se encuentren cercanos y esto suele presentarse en enfermedades relacionadas a denervaciones (fig 20).

Cuando la atrofia se presenta en forma perifascicular generalmente se asocia a miopatías inflamatorias y refleja cambios isquémicos secundarios en vasos.



Fig. 20 Fibras pequeñas angulares (flechas) con NADH-TR 800x.

Predominio de tipo de fibra

En el músculo normal tratado con métodos histoquímicos las fibras presentan una distribución de agrupamiento conocido como mosaico. En algunas biopsias, se pueden hallar grandes grupos de fibras del mismo tipo vecinadas. Estos cambios están en relación con las reinervaciones del músculo. En el hombre se asocia a un proceso denervativo crónico.

Para considerar cuando un tipo de fibra es dominante es necesario conocer la proporción normal de cada tipo de fibra en el músculo y tomarse en cuenta edad y sexo del paciente. Generalmente la proporción del músculo es de 1:2 respectivamente para fibras tipo 1 y 2 en músculos bíceps y cuádriceps. Es importante tener este control para reconocer cuando hay predominio o deficiencia de un tipo de fibra.

Dubowitz y Brooke, 1973 encontraron que las fibras tipo 1 eran predominantes cuando estaban presentes en proporción > a 55% y el tipo 2 era dominante cuando se encontraba en proporción > a 80%, esto tomando en cuenta a los 2 subtipos.

La abundancia de fibras de tipo 1 se asocia con miopatías y con distrofias que tienen un origen genético. En cambio el predominio de fibras de tipo 2 se encuentra relacionado con enfermedades de la neurona motora. La deficiencia de algún tipo de fibra se define con su presencia en menos de un 10% con respecto al total de fibras normales.

Cambios nucleares

El núcleo es muy susceptible a los cambios patológicos. Entre estos cambios los más comunes observados en el músculo patológico son los que se mencionan a continuación:

Núcleos internos.

Se encuentran localizados en la sustancia de la fibra muscular, siendo normales cuando se encuentran presentes en un porcentaje menor a 3%. El análisis de las fibras en corte transversal es importante para determinar este porcentaje.

Una gran proliferación de núcleos internos sugieren una miopatía. Una excepción son las neuropatías crónicas periféricas, como la atrofia muscular peroneal (Charcot-Marie-Tooth).

Cuando 100% de los núcleos se encuentran en posición central dentro de la fibra se debe pensar en la miopatía tubular que en algunas ocasiones se asocia a hipertrofia o atrofia de las fibras tipo 1.

Núcleos Vesiculares.

Uno de los cambios que el núcleo puede presentar es la formación de vesículas que lo involucionan completamente; generalmente el nucleolo se observa prominente. Tal cambio se encuentra relacionado con las fibras basofílicas y con evidencias de regeneración. Solo cuando se encuentran en gran número se asocian a miopatías.

Núcleos Tigroides.

Se observan cuando la cromatina se encuentra en forma granular; se asocian a neuropatías y en algunas ocasiones se presentan en distrofia miotónica.

Núcleos Picnóticos Agrupados.

Pueden observarse pequeños grupos de núcleos que se tiñen en color oscuro. Estos cambios pueden observarse cuando se ha presentado una denervación o en las distrofias de cinturas

Cambios de regeneración y degeneración.

Estos cambios pueden observarse con técnicas como hematoxilina-eosina o con el tricrómico de Gomori a nivel de fibras individuales. La necrosis de fibras musculares se observa en las miopatías (fig. 21), pero ocasionalmente se puede encontrar en procesos degenerativos como la esclerosis lateral amiotrófica o en la neuropatía crónica periférica.

Un tipo de degeneración más es la que se conoce como fibra granular, en la cual se observa material con aspecto de gránulos azulados, con la tinción de hematoxilina-eosina. Este material se tiñe de rojo con el tricrómico de Gomori. Estas fibras granulares pueden presentarse como un fenómeno aislado que se asocia con desórdenes oftalmopléjicos.

Las fibras basofílicas son parte del proceso de regeneración del propio músculo; con la tinción de hematoxilina-eosina, el citoplasma adquiere un color azul. Están presentes en las miopatías como la distrofia de tipo Duchenne en su etapa temprana, así como en algunos casos de traumatismo o de isquemia muscular.

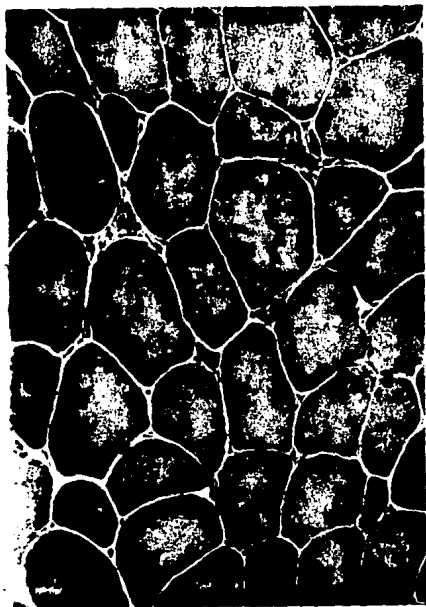


Fig. 21 Alteraciones patológicas, como fibras necróticas (flechas pequeñas), fibras atróficas (flechas grandes) y núcleos interiores aumentados (flechas curvas). H-E 400x.

Fibras partidas

En las fibras partidas el núcleo sarcolemal se observa a lo largo de una división o septo en la fibra (fig 22). Este fenómeno es normal en uniones miotendinosas, los núcleos que se observan son internos y profusos. Son abundantes en distrofias de cinturas y ocasionalmente se presentan en atrofia muscular peroneal.

Reacciones celulares.

Entre las fibras musculares se pueden presentar respuestas celulares por condiciones patológicas. las respuestas de histiocitos, linfocitos o de leucocitos polimorfonucleares de las células plasmáticas son más difíciles de identificar en material congelado, por lo que se recomienda hacer estos estudios en material fijado para parafina.

En la polimiositis las reacciones pueden variar de una zona focal a otra, de igual manera los tipos celulares cambian de acuerdo a las condiciones en que se presenten (Engel 1986).

En atrofas neurogénicas las reacciones celulares son menos frecuentes a excepción de las neuropatías crónicas.

En algunas situaciones puede ocurrir proliferación del tejido conectivo endomisial la cual separa individualmente las fibras musculares. La fibrosis la podemos encontrar más frecuentemente en las miopatías y es característica de la distrofia de tipo Duchenne. También se puede encontrar en atrofas neurogénicas y en algunos casos severos de atrofas musculares espinales (Brooke 1969 b).

Cambios arquitecturales.

Las fibras individuales sufren cambios en su arquitectura y éstos pueden ser los siguientes:

Corazones Centrales.

Fueron descritos por Shy y Magee en 1956 y son de dos tipos, estructurados y no estructurados.

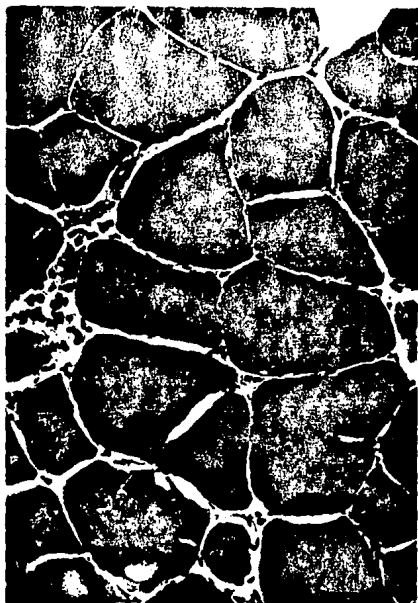


Fig. 22 Aspectos degenerativos como necrosis y fagocitosis (flechas grandes) de las fibras y fibras en partición (flechas pequeñas). 800x.

En los corazones estructurados se puede observar una zona no teñida cuando se trata al tejido con una reacción de oxidación enzimática, como puede ser la NADH.

Con la ATPasa la zona del corazón es reactiva y puede dar una reacción más fuerte que el resto de la fibra. En el estudio con microscopía electrónica la diferencia puede observarse en base a las mitocondrias que no se encuentran en la zona donde se localiza el corazón central. Otra diferencia que se observa entre la zona del corazón y la zona de la sarcomera, en donde ésta es más concentrada y recortada en las bandas I y la zona H, la línea Z puede ser manchada y estar en zigzag. Hay mayor tendencia a que se presente en las fibras de tipo 1 (Dubowitz 1985).

Los corazones no-estructurados presentan distorsión completa de la arquitectura y no tiene una estructura cruzada dentro de la zona del corazón. Con ATPasa aparecen como una área pálida en la fibra. Con microscopía electrónica se puede observar que la sustancia miofibrilar se encuentra desorganizada en el área que correspondía a la estriación. El área de la línea Z se encuentra distorsionada y da la apariencia de zigzag. Las mitocondrias están ausentes y hay abundancia de material tubular que puede representar al sistema T (Dubowitz 1985).

Fibras Apolilladas.

La apariencia de las fibra apolilladas se debe a pequeñas áreas en la fibra donde no hubo reacción oxidativa, predominantemente en las fibras de tipo 1 (fig. 23). La presencia de gran número de estas fibras suele asociarse a miopatías, aunque en muchos casos se relaciona a la enfermedad de Parkinson o a polimialgia reumática y en algunos niños con síndrome de espina rígida (Dubowitz, 1973).

Fibras en anillo y masas sarcoplásmicas.

En técnicas de rutina la orientación normal de las fibras se encuentra alterada en grupos de miofibrillas que corren en ángulo recto con el eje medio de la fibra; lo que da la apariencia de una estriación anular o de un anillo alrededor de la fibra, el cual no es solamente periférico (fig. 24, 25).



Fig. 23 Aspecto de las fibras apolilladas, que se aprecia en técnicas oxidativas, como alteración del patrón de la red intermiofibrilar. NADH 800x.



Fig. 24 Fibra en anillo, los paquetes de microfibrillas de la periferia, tienen una orientación diferente a la parte central de la fibra, lo que semeja un corte longitudinal. NADH-TR 800X.



Fig. 25 Aumento mayor de una fibra en anillo donde se observa claramente la orientación de las miofibrillas de la periferia. NADH-TR 2000x.

Generalmente se encuentran asociadas a masas irregulares de sarcoplasma que se extiende fuera del anillo. Es común encontrarlos en enfermedades como miopatía crónica y en distrofias de cinturas y en otras como atrofia espinomuscular y artritis reumatoide (Dubowitz, 1985).

Anormalidades mitocondriales.

Fueron observadas por Shy, Gonatas y Pérez en 1966 en 2 casos de miopatía infantil y, se presentaron como anomalías de tamaño, número y distribución de los organitos.

Se pueden observar claramente bajo microscopía electrónica. Se sospecha su presencia, cuando en las técnicas de oxidación de enzimas las fibras musculares tienen formas aisladas de apariencia granular densa.

Histogramas.

La construcción de histogramas facilitan el análisis y la cuantificación del tamaño de las fibras musculares ya que es un método sencillo y reproducible. Suelen emplearse diferentes parámetros para la construcción de histogramas:

Se pueden medir diámetros ortogonales, la circunferencia de la fibra, la superficie del área de la fibra y el diámetro de la fibra muscular. Dubowitz, et al, 1973, emplearon un método de combinación simple y rápido que prueba ser efectivo; este consiste en medir el diámetro menor de la fibra.

Para hacer una evaluación representativa del material es necesario medir 100 fibras del músculo. A todas las medidas del diámetro se sacará la desviación estándar que puede ser calculada para cada histograma y podrá hacerse la comparación con valores normales ya conocidos para cada músculo de acuerdo a la edad y sexo del paciente (fig. 26, 27).

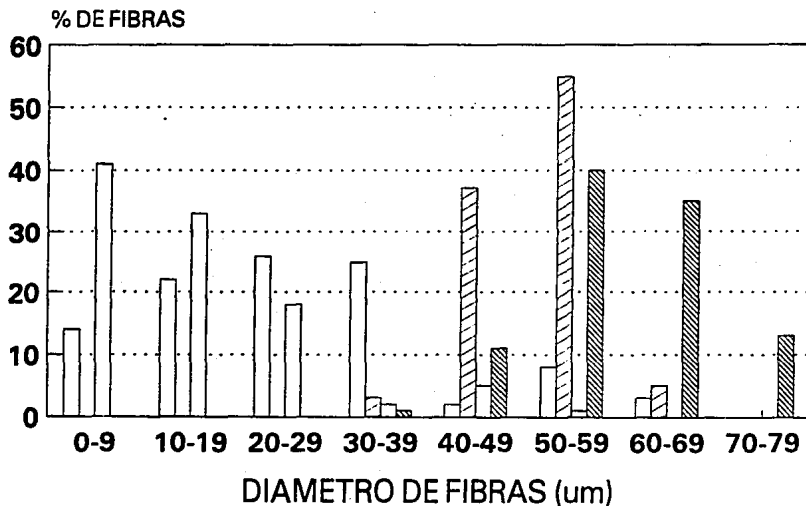
El Coeficiente de variabilidad se calcula de la siguiente manera:

$$C.V = \frac{\text{Desviación estandar} \times 1000}{\text{Diámetro medio}}$$

FRECUENCIA DE FIBRAS MUSCULARES

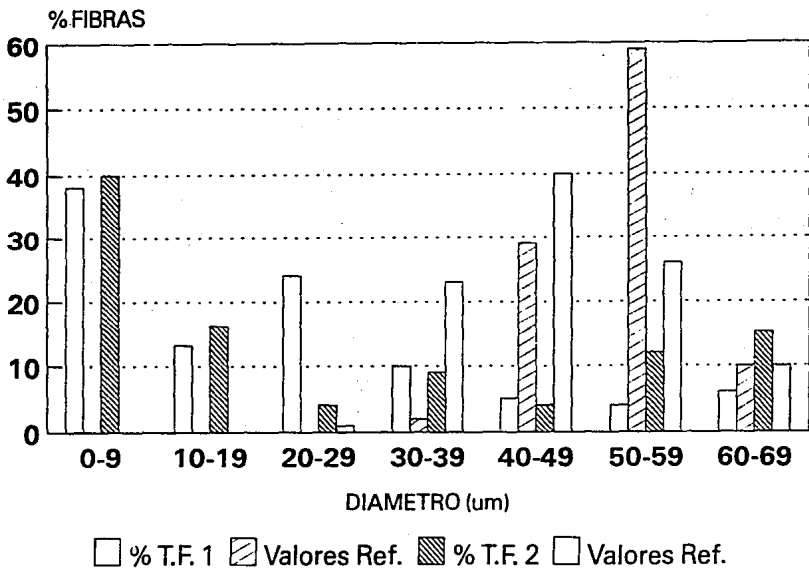
TIPOS DE FIBRAS 1 y 2 (Hombres)

BIOPSIA T-1
 CONTROL T-1
 BIOPSIA T-2
 CONTROL T-2



FRECUENCIA DE FIBRAS MUSCULARES

TIPOS DE FIBRAS 1 y 2 (Mujeres)



Ningún tipo de fibra con coeficiente de variabilidad menor a 250 se considera anormal, para el tamaño de la fibra. En el caso de los niños se presentan algunas diferencias. En biopsias normales el diámetro de las fibras de tipo 1 y 2 no difieren más del 12 % con respecto al valor del diámetro mayor de la fibra más grande que se presente.

El coeficiente de variabilidad igualmente en condiciones normales debe ser menor que 250.

Factores de Atrofia e Hipertrofia

Para calcular estos factores se elabora un histograma de las fibras musculares en el que representa el número de fibras grandes o pequeñas, los valores para las fibras normales en hombres es de 40 a 80 μm de diámetro y para mujeres es de 30 a 70 μm por lo que las fibras que se encuentran por debajo de estos valores se les considera anormales pequeñas tanto para hombres como para mujeres. Tanto las fibras que se encuentran en el intervalo de 30 a 40 μm en un momento dado pueden tener un significado menor si se comparan con un mismo número de fibras del intervalo de 10 a 20 μm . Para comprobar esto se multiplica el número de fibras que se encuentran en el rango del diámetro entre 30 y 40 μm por 1 y el número de fibras con diámetro entre 20 y 30 μm por 2 y el número de fibras de 10 a 20 μm por 3 y las fibras con diámetro menor a 10 se multiplican por 4. Estos resultados se sumarán y se dividirán entre el número de fibras totales del histograma, esto nos dará la base proporcional. El valor resultante se multiplicará por 1000 y éste será el factor de atrofia.

El factor de hipertrofia se puede calcular de la misma manera, tomando la proporción de fibras que se encuentren con diámetro mayor tanto en hombres como para mujeres. En cálculos diagramáticos se puede considerar cada tipo de fibra por separado, así como cada tipo histoquímico de fibra dará 2 números, factor atrofico (A) y factor hipertrofico (H). Los resultados del histograma se podrán dar en serie de 4 números A1, H1; A2A, H2A; A2B, H2B. Estos factores son útiles sobretudo para determinar atrofia o hipertrofia que puede no ser aparente en la inspección de rutina en la biopsia (Brooke, 1969c) y para mostrar la presencia de atrofia selectiva por un tipo de fibra en asociación con hipertrofia de otro tipo. (Tabla IV), (fig. 28)

Tabla IV

Límites superiores para los valores de factores de atrofia e hipertrofia de adultos normales (um) en hombres y mujeres.

	Tipo 1		Tipo 2 A y B	
	Atrofia	Hipertrofia	Atrofia	Hipertrofia
<i>Biceps</i>				
Hombres	150	300	150	500
Mujeres	100	200	150	150
<i>Gastrocnemio</i>				
Hombres	150	150	150	400
Mujeres	100	400	200	150

Brooke, Engel (1969)

Fig. 28

Factores de atrofia e hipertrofia

O de fibras	a 0-10	b 10-20	c 20-30	d 30-40	e 40-80	f 80-90	g 90-100	h 100-110	110-120
Hombre	x4	x3	x2	x1	0	x1	x2	x3	x4
O de fibras	i 0-10	j 10-20	k 20-30	l 30-70	m 70-80	n 80-90	90-100		
	x3	x2	x1	0	x1	x2	x3		

x = multiplicar las fibras encontradas en ese intervalo por 1, 2, 3 ...

$$\text{Factor de atrofia en hombres: } \frac{a + b + c + d \times 1000}{T}$$

$$\text{Factor de hipertrofia en hombres: } \frac{e + f + g \times 1000}{T}$$

T = No. total de fibras medidas

$$\text{Factor de atrofia en mujeres: } \frac{h + i + k \times 1000}{T}$$

$$\text{Factor de hipertrofia en mujeres: } \frac{l + m + n \times 1000}{T}$$

6. MATERIAL Y METODOS

Para poder realizar el análisis del material de las biopsias que se procesaron para éste trabajo de tesis se siguió la metodología que a continuación se plantea.

Se analizaron las biopsias practicadas a 100 pacientes que fueron remitidos al Laboratorio de Neuropatología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, de diferentes instituciones hospitalarias, con diagnóstico presuntivo de miopatía. Los pacientes que se recibieron fueron tanto hombres como mujeres y la edad en ambos casos fue muy variable desde infantes hasta adultos. La biopsia fue tomada de los músculos con afectación intermedia y se prefirieron los músculos gastrogmenio y bíceps, por tener valor normales conocidos de estos músculos.

Después de seleccionar al paciente con los criterios que ya se mencionaron anteriormente, se observó la toma de la biopsia para indicar al cirujano cual era el músculo más adecuado para el estudio. Terminada la cirugía, la biopsia se recibió en una gasa húmeda con solución fisiológica (suero común) fría. Se guardó en una bolsa de plástico para conservar la humedad y se dejó reposar la muestra en el refrigerador a 4 - 5 C por 30 minutos para la relajación del músculo.

El músculo obtenido primero se cortó en dos partes iguales, cuidando la orientación del músculo, una de éstas partes se utilizó para el proceso de congelación. La parte restante se volvió a fragmentar en dos partes de diferente tamaño, la porción de tejido más grande se introdujo en una solución de formalina al 10% y se siguió el procesamiento para inclusión en parafina. El material más pequeño se procesó para microscopía electrónica y se fijó en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilatos 0.1M, pH 7.2 durante dos horas como máximo y se pasó a amortiguador de cacodilatos para lavar, posteriormente se mantuvo en refrigeración ó se procesó inmediatamente.

Para procesar el fragmento por congelación. Sida et, al 1991

a) Se sacó el fragmento del refrigerador

b) Se tomó el músculo con las pinzas y se pasó a una caja de petri que contenía talco y se cubrió totalmente el músculo procurando que la capa de talco que lo rodea por fuera lo más gruesa posible

c) Se introdujo la muestra en un recipiente con nitrógeno líquido por 30 segundos

d) Se colocó la muestra congelada en la platina del criostato, la cuál debía estar fría y tener en el centro una base de medio de montaje para congelación (Tissue-Tek).

e) La muestra se cubrió totalmente con Tissue-Tek y se sumergió en el nitrógeno líquido toda la pieza (platina y tejido) por un tiempo de hasta 1 minuto ó el necesario para que la pieza tomará la temperatura del nitrógeno, que es cuando este deja de ebullicir.

f) Se colocó la platina en el criostato; la pieza se encontró lista para ser cortada en secciones de 8-10 μ m.

g) Los cortes se adhirieron en portaobjetos ; se obtuvieron de 10 a 12 laminillas por caso.

A cada laminilla se le aplicó uno de los métodos de rutina que se utilizan en el laboratorio:

- A) Hematoxilina-Eosina
- B) Tricrómico de Gomori modificado
- C) ATPasa pH 4.3, 4.6 y 9.4
- D) NADH O DPNH

Procesamiento para inclusión en parafina

1.- Se recibió la muestra en gasa humedecida en suero fisiológico o en formalina al 10%.

2.- Se fijó la muestra en formol al 10% por un tiempo que pudo variar entre 6 y 24 horas ó se fijó en glutaraldehído por un tiempo máximo de 1 hora y media, según el tamaño de la muestra.

3.- Se lavó el tejido en agua corriente de 30 a 60 minutos

4.- Terminado el lavado se colocó la muestra en rejillas o cassettes especiales registrando el número de caso que representa. La rejilla se colocó en la canastilla del procesador de tejidos para deshidratar en alcoholes graduales, aclarar en xilol y hacer la preinclusión en parafina. El tiempo de procesamiento en cada paso fue de una hora.

- 5.- Se incluyó la muestra en un bloque de parafina.
- 6.- Los cortes se realizaron en un microtomo a 6µm de espesor.
- 7.- Para hacer la adhesión de los cortes al portaobjetos , se pusieron los cortes en un baño de flotación el cual contenía agua corriente y gelatina Q. P., a una temperatura de 40 a 45 C espolvoreada en la superficie.
- 8.- Se dejaron secar las laminillas usando la plancha caliente.
- 9.- Se desparafinaron en 2 cambios de 15 minutos cada uno en xilol y se hidrataron con alcoholes graduales hasta agua destilada.
- 10.- Los cortes estuvieron listos para que se les practicarán algunas de las técnicas de rutina como son Hematoxilina-Eosina o el Tricrómico de Gomori.

Procesamiento para microscopía electrónica

- 1) Se recibió la muestra y se seccionó en fracciones muy pequeñas, 1 mm³ las cuales debieron ser más largas que anchas y en las que se observó una orientación trasversal del tejido.
- 2) Se guardó la muestra en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato 0.1M a pH 7.2, por una hora.
- 3) Se enjuagó la muestra en amortiguador de cacodilatos 10 minutos
- 4) Se postfijó el tejido en tetraóxido de osmio al 1% por una hora
- 5) Se lavó la muestra en amortiguador de cacodilatos por 10 minutos
- 6) Se procedió a la deshidratación con acetona, para músculo se emplearon acetonas a diferentes concentraciones: 50 , 70 , 90 , y dos cambios en acetona de 100, 10 minutos en cada cambio. Las diluciones de acetona se hicieron con agua destilada.
- 7) La preinclusión se hizo en acetona-100%-EPON por 18 horas
- 8) Pasado este tiempo se incluyó en EPON y se dejó polimerizar a 60 C , por 18 horas.

Se hicieron secciones de 1 micrómetro de espesor, los que se tiñeron con azul de toluidina y se examinaron bajo microscopía óptica, para seleccionar el área de estudio.

Las secciones finas se hicieron de color gris-plata del espectro de colores de interferencia, y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Se examinaron bajo un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10

Métodos cuantitativos

A. Usando una reglilla graduada asociada a un microscopio óptico Docuval, se midió el diámetro de 100 fibras de tipo 1 y 100 fibras de tipo 2, por la parte de mayor diámetro de la fibra. Se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad (desviación estándar \times 1000 / media). Los coeficiente de atrofia e hipertrofia se calcularan de acuerdo a los criterios descritos por Dubowitz, 1973.

B. Se contaron aproximadamente 250 fibras, para obtener el número de fibras que tenían núcleos interiores, y así obtener su porcentaje.

C. La proporción de fibras de tipo 1 y de tipo 2 presentes, se calculó en aproximadamente 100 fibras, para saber cuantas fibras de tipo 1 y de tipo 2, se encontraban. Y se obtuvo un porcentaje para cada uno de los tipos.

7. TECNICAS HISTOQUIMICAS

Estas son las técnicas histológicas e histoquímicas con las cuales se procesarob las biopsias de músculo, para el análisis y diagnóstico clínico.

A) Hematoxilina-eosina

Está técnica se realiza en primer lugar para verificar si la orientación de las fibras es la adecuada y se realiza por congelación o por cortes en parafina.

Quando se hace en cortes por congelación:

- 1.- Se dejan secar las laminillas a temperatura ambiente.
- 2.- Se introducen en una solución de hematoxilina durante 2 minutos.
- 3.- Se pasa a agua de la llave hasta eliminar el exceso de colorante.
- 4.- La preparación se pasa rápidamente por carbonato de litio para hacer el viraje en el tejido
- 5.- Se lava en agua de la llave (2 cambios)
- 6.- Se introduce a la eosina por 30 segundos.
- 7.- Se deshidrata en alcohol etilico de concentracion creciente de 96, absoluto y en la mezcla alcohol absoluto-Xilol, dejándolo 3 minutos en cada una.
- 8.- Aclarar en xilol
- 9.- Montar en resina.

B) Tricrómico modificado de Gomori.

Está técnica se puede emplear en cortes por congelación o en cortes por parafina.

- 1.- Los cortes por congelación se dejan secar a temperatura ambiente. Los cortes de parafina se hidratan hasta agua destilada para empezar la técnica.
- 2.- Aplicar la Hematoxilina de 4 a 5 minutos.
- 3.- Lavar en 3 cambios rápidos de agua destilada.
- 4.- Aplicar el tricrómico durante 10 a 12 minutos.
- 5.- Diferenciar en solución acuosa de ácido acético al 0.2% en 5 lavados o hasta que pierda el color rojo.
- 6.- Deshidratar en alcohol etílico de concentración creciente de 96% dos cambios, un cambio en alcohol absoluto, alcohol absoluto-xilol por 3 minutos en cada uno.
- 7.- Aclarar en xilol
- 8.- Montar en resina.

soluciones

Solución Tricrómica

Cromatope 2R	0.3 gr.
Fast green FCF	0.15gr
Acido fosfotúngstico	0.3 gr.
Agua destilada	50 ml
Acido acético	0.5 ml.

Ajustar a pH 3.4 con solución saturada de acetato de sodio. Después de una semana se desecha.

Solución de Hematoxilina de Mayer.

Cristales de hematoxilina	1.0 gr.
Agua destilada	1000 ml
Yodato de sodio	0.2 gr.
Alumbre de potasio	50. gr
Acido cítrico	1.0 gr.
Hidrato de cloral	50. gr

Se disuelve el alumbre en el agua sin calentar y agregar la hematoxilina, el yodato de sodio, el ácido cítrico y el cloral después. Agitar hasta que todo este disuelto.

C) ATPasa (Adenosin trifosfatasa)

En está técnica se emplea una preincubación para los pHs ácidos; el pH básico es conocido como de rutina y no necesita de preincubación.

- 1.- Se preincuban las secciones en amortiguador de acetato de sodio a pH 4.3 ó 4.6 durante 10 minutos
- 2.- Se enjuagan bien en 3 cambios de agua destilada
- 3.- Se incuban las secciones en el medio de incubación Tris y sal de Adenosin 5-trifosfato a pH 9.4 por 30 minutos a 37 C. Pasado este tiempo la solución es desechada.
- 4.- Pasar sin enjuagar a cloruro de calcio al 2% durante 3 minutos
- 5.- Se transfieren de inmediato las secciones de tejido a una solución de cloruro de cobalto al 2% por 3 minutos
- 6.- Lavar perfectamente en agua destilada en 10 cambios de 1 minuto cada uno.

- 7.- Transferir las secciones a una solución de sulfuro de amonio al 0.1 % por 10 segundos o hasta que se observe el color negro en el tejido . Este paso debe hacerse en campana de extracción por el desprendimiento de gases tóxicos del sulfuro de amonio.
- 8.- Lavar en agua de la llave de 5 a 10 minutos y observa bajo el microscopio que se han removido los precipitados
- 9.- Deshidratar en alcohol etílico de concentración graduales creciente de 96 dos cambios, absoluto y absoluto-xilol por 3 minutos en cada uno.
- 10.- Aclarar en Xilol.
- 11.- Montar en resina.

Soluciones

Solución de amortiguador TRIS-HCl-CaCl₂

Solución A: (0.2 M TRIS) : 2.42gr TRIS pm.121 en 100ml de agua destilada.

Solución B: (0.2 N HCl) : 1.7 ml de HCl en 100ml de agua destilada.

Amortiguador a pH 9.0 : 25 ml de la solución A + 2.5 ml de solución B; aumentar hasta 100 ml de agua destilada.

Para cada 100 ml de solución añadir 1.998 gr de CaCl₂.

Soluciones de Amortiguadores de Acetatos.

Solución A (ácido acético 0.2 M)

1.2 ml de ácido acético glacial en 100ml de agua destilada.

Solución B (Acetato de sodio 0.2 M)

1.64 gr de acetato de sodio anhidro pm 82 ó 2.72 gr de acetato de sodio trihidratado, pm 136 en 100 ml de agua destilada.

Para pH 4.3 : 33.2 ml de la solución A y 16.8 ml de la solución B, aumentar agua destilada hasta que se alcancen los 100 ml.

Para pH 4.6 : 25.5 ml de solución A y 24.5 ml de solución B, agregar agua destilada hasta que se alcance los 100 ml de solución.

Medio de Incubación

Sal disódica de ATP 40mg

Amortiguador TRIS 30ml

Ajustar el pH 9.4 con NaOH 0.1N Es una solución turbia que debe volverse límpida

Solución de Sulfuro de amonio diluida al 4 %

D) NADH o DPNH (Diaforasa reducida difosfopiridina nucleotida)

- 1.- Se incuba en el medio por 30 minutos a 37 C ó 1 hora y media a temperatura ambiente.
- 2.- Se enjuaga en agua destilada en un cambio
- 3.- Se monta en glicerol o en PVP.

Soluciones

Amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.4

Solución de trabajo

Solución A: (0.2 M dihidrógeno de sodio ortofosfato)

3.12 gr de dihidrógeno sodio ortofosfato anhidro pm 156 en 100 ml de agua destilada.

Solución B: (0.2 M de Hidrógeno disodio ortofosfato)

2.83 gr de Hidrogeno de sodio ortofosfato anhidro pm 142 en 100 ml de agua destilada

Para preparar 250 ml de amortiguador a pH 7.4

Se toman 23.7 ml de la solución A + 101.8 ml de la solución B y se aforan a 250 ml con agua destilada.

Medio de Incubación

1.- Agua bidestilada	4.0 ml
2.- Nitroblue Tetrazolium	4.0 mg
3.- NADH o DPNH	10.0 mg
4.- Buffer de fosfatos	6.0 ml

Se mezcla todo y se coloca en una caja de petri a las preparaciones para colocar el medio de incubación.

8. RESULTADOS Y COMENTARIOS

El objeto de unir estos dos capítulos es ofrecer al lector no familiarizado con los aspectos clínicos de las enfermedades musculares una breve discusión antes de la presentación de los resultados histológicos.

De los pacientes incluidos en el siguiente trabajo, a quienes se les realizó biopsia muscular entre los meses de junio de 1990 y diciembre 1991.

61 pacientes correspondieron al sexo masculino y
39 pacientes correspondieron al sexo femenino, (fig 29).

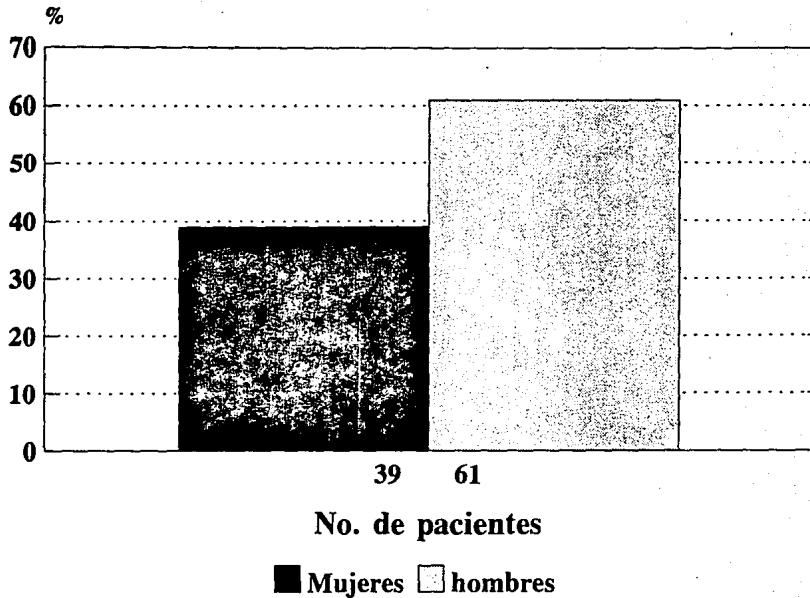
La distribución por edades en hombres y mujeres, puede ser vista en las figuras 30 y 31 respectivamente.

Los músculos donde se realizaron las biopsias fueron (fig 32):

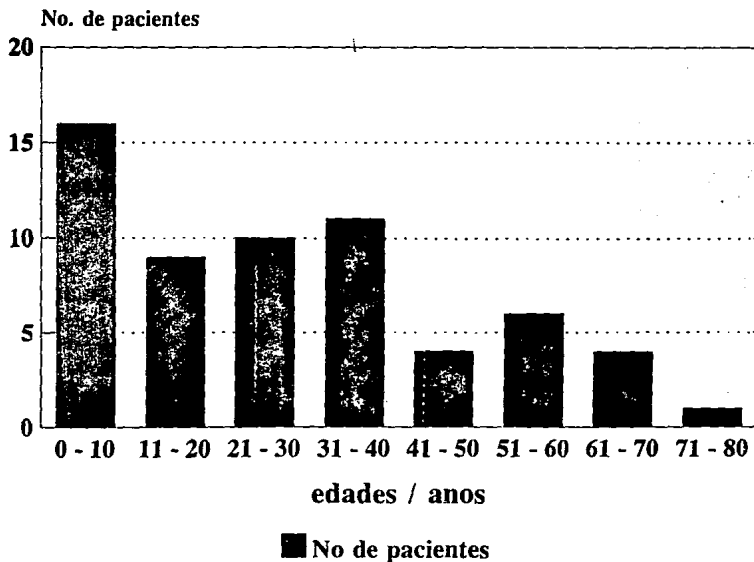
Cuadriceps	44.0%
Bíceps	39.0%
Gastrocnemio	11.0%
Deltoides	3.0%
Gemelo	1.0%
Sartorio	1.0%

Fig. 29

Pacientes por sexo



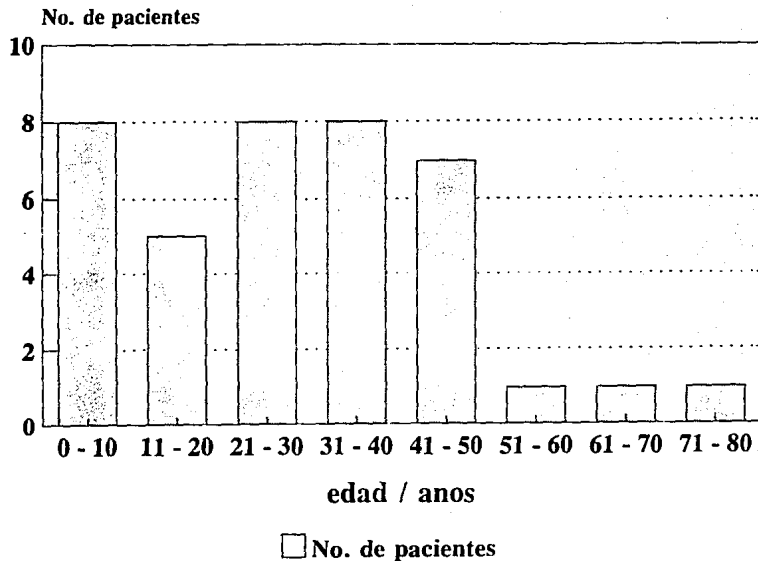
Enfermedades en hombres



Araceli Miranda Vega

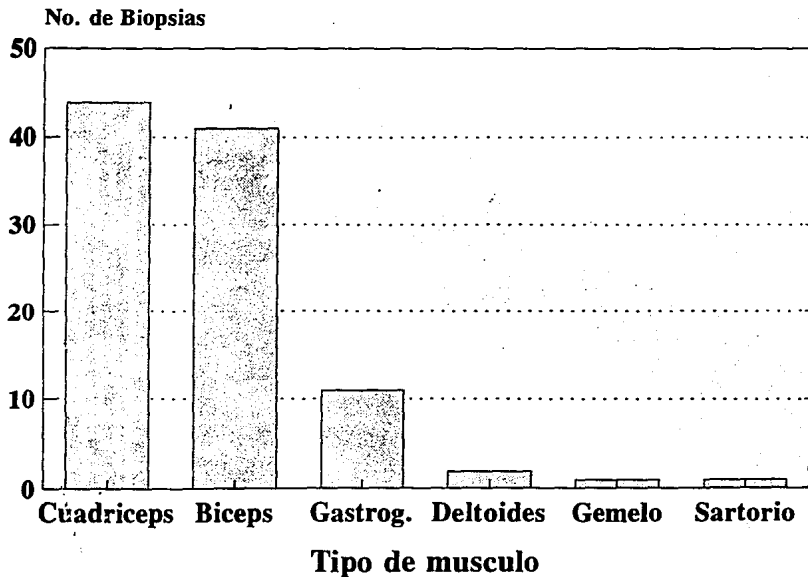
Fig. 31

Edades en mujeres



Araceli Miranda Vega

Musculos estudiados



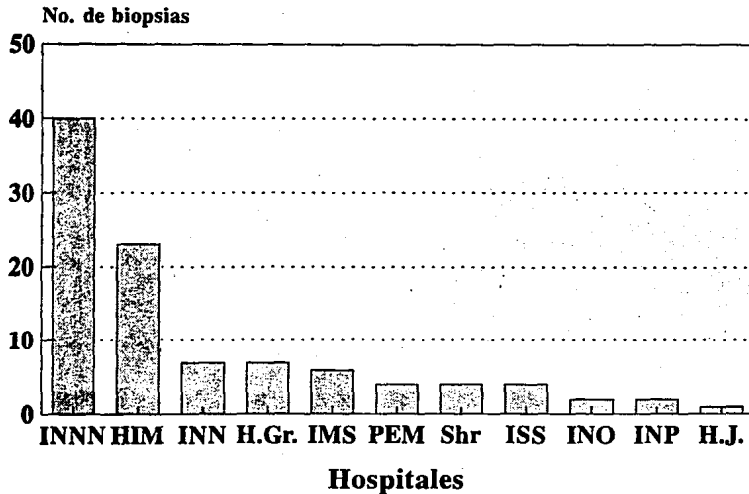
Los hospitales que nos enviaron las muestras fueron muy importantes en este trabajo, ya que sin los cuales no se hubiera terminado esta tesis. Los hospitales que aportaron muestras fueron (fig 33):

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	40.00%
Hospital Infantil de México	23.00%
Instituto Nacional de la Nutrición	7.00%
Instituto Mexicano del Seguro Social	7.00%
Hospital General de México	6.00%
Hospital General de Petróleos Mexicanos	4.00%
Hospital Shriners para Niños Lisiados	4.00%
ISSSTE	4.00%
Instituto Nacional de Ortopedia	2.00%
Instituto Nacional de Pediatría	2.00%
Hospital Juárez	1.00%

Los diagnósticos emitidos, en los estudios realizados a las biopsias musculares de los pacientes estudiados fueron como siguen (Tabla V, fig 34):

23	Histologicamente Normal
19	Procesos de Denervación
10	No específicos
9	Distrofia Miotónica
6	Proceso de Denervación y reinervación
5	Distrofia de tipo Duchenne
5	Distrofias de tipo Cinturas
3	Polimiositis
3	Atrofia de fibras de Tipo 2
2	Atrofia Universal de fibras
2	Atrofia Muscular Espinal
2	Distrofia muscular Facio-Escapulo-Humeral
2	Distrofia Oculofaríngea
2	Miopatías mitocondriales
1	Miotónia Congénita
1	Corazones Centrales
1	Deficiencia de Carnitina
1	Agregados Tubulares
1	Miopatía Nemaalínica
1	Distrofia tipo Becker
1	Hipertrofia de fibras

Hospitales aportadores de pacientes para biopsia de musculo

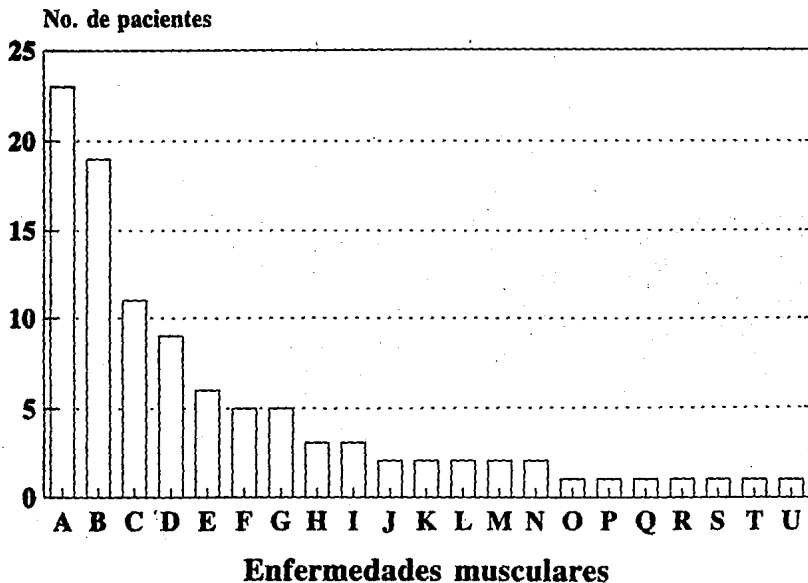


Enfermedades Diagnosticadas

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| A. Normales | K. Atrofia Muscular Espinal |
| B. Denervacion | L. Distrofia Facio-E-Hum. |
| C. No especificos | M. Distrofia Oculofaringea |
| D. Distrofia Miotonica | N. Miopatia Mitocondrial |
| E. Denervacion y reinervacion | O. Miotonia congenita |
| F. Distrofia de Duchenne | P. Corazones Centrales |
| G. Distrofia de Cinturas | Q. Hipertrofia de Fibra |
| H. Polimiositis | R. Def. de Carnitina |
| I. Atrofia de fibras T2 | S. Agregados Tubulares |
| J. Atrofia universal | T. Distrofia de Becker |
| | U. Miopatia nemalinica |

Araceli Miranda Vega

No. de pacientes/miopatía



8.1 Distrofia Muscular Duchenne

Entre 1861 y 1868 Guillaume Benjamin Amand Duchenne, hace la descripción de esta enfermedad (Emery). Que tiene una herencia ligada al sexo, por lo que está ligada al cromosoma X.

Tiene sus primeras manifestaciones entre los 2 y los 5 años de edad y se observa con mayor claridad al inicio de la deambulación. Entre los síntomas que presenta está el retraso al caminar, las caídas frecuentes, dificultad para subir escaleras.

Clinicamente hay marcha anormal, signo de Gowers positivo, incapacidad para correr o saltar. La debilidad es principalmente en los músculos proximales y más en las piernas que en los brazos. Se observa una marcada hipertrofia de las pantorrillas.

Otras entidades asociadas son las cardiopatías, el pie equinovaro, contracturas de flexión.

Los estudios de laboratorio revelan la Creatin-fosfo-cinasa (CPK) muy elevada, el patrón de la electromiografía (EMG) es miopático. Estos pacientes tienen pérdida progresiva de la función, pérdida de la capacidad ambulatoria total entre los 9 y 12 años de edad. Observan afecciones de las vías respiratorias en las últimas etapas de la enfermedad. El pronóstico de vida de estos pacientes es entre los 16 y 20 años

La biopsia muscular muestra:

Cambios progresivos característicos como la degeneración y regeneración, necrosis, fagocitosis, infiltrado inflamatorio, variación anormal del diámetro de las fibras musculares, con atrofia e hipertrofia, presencia de fibras partidas, aumento en el número de núcleos interiores. Las fibras degeneradas son reemplazadas por tejido conectivo peri e intrafascicular, así como, proliferación de tejido adiposo, resultado de la progresiva debilidad muscular (Marshall, 1989) (fig. 35, 36, 37).

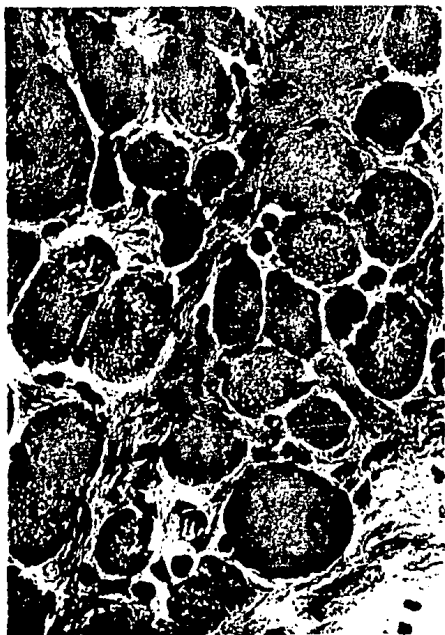


Fig. 35 Aspecto del músculo con distrofia de tipo Duchenne, donde se aprecian, fibras basofílicas (estrellas) con tejido conectivo intra y perifascicular aumentados. H-E 800x.

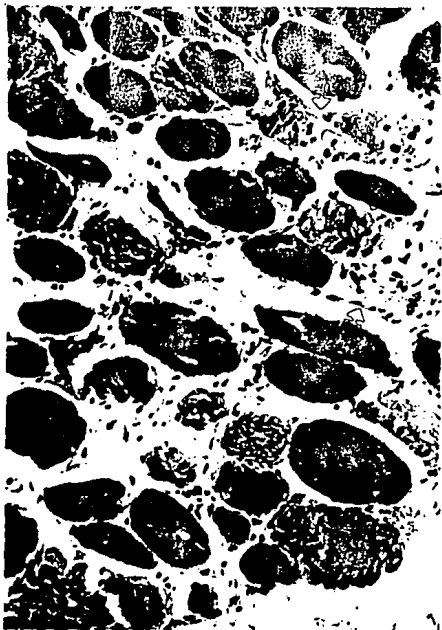


Fig. 36 Fibras necroticas (flechas abiertas) y variación del diámetro de las fibras en distrofia de tipo Duchenne. H-E 400x.



Fig. 37 Otro aspecto de degeneración de las fibras musculares, en distrofia de tipo Duchenne, con fibras necroticas (flechas abiertas) y proliferación de tejido, conectivo. T.Gomori 400x.

8.2 Distrofia Tipo Becker

En 1953 P.E. Becker describe una familia típica integrada por 20 pacientes, la cual había sido estudiada por Kostakow y Devix como distrofia ligada, al cromosoma X, posteriormente se encontró que era el mismo alelo de la distrofia Duchene, con el mismo locus Xp21. Esta entidad presenta un cuadro similar al de la distrofia de tipo Duchenne, aunque más benigno de progresión más lenta. Su edad de inicio es después de los 5 años, en la adolescencia e incluso hasta la edad adulta. Estos pacientes cursan con dificultad al correr o subir escaleras, calambres durante el ejercicio. Clínicamente, hay debilidad funcional, debilidad en músculos proximales, prominencia de pantorrillas, marcha anserina y lordosis. . Hay asociación cardíaca leve. Tienen progresión lenta como se ha mencionado, y su evolución es variable. Estos pacientes tienen capacidad ambulatoria después de los 16 años y la expectativa de vida depende de la progresión misma de la enfermedad, así como de la aparición de insuficiencia respiratoria . Los niveles de CPK son frecuentemente muy elevados, tanto como los observados en distrofia de tipo Duchenne. El electromiograma es con patrón miopático.

En la biopsia muscular podemos observar:

Cambios distróficos variables tales como atrofia de ambos tipos e hipertrofia de T 2, hay aumento en los núcleos interiores, cambios degenerativos como necrosis, fagocitosis, infiltrado inflamatorio probable. Se observan también cambios de regeneración de las fibras, como fibras basofílicas. Hay pérdida variable de fibras y proliferación de tejido adiposo o tejido conectivo. Se pueden observar focos de fibras atroficas como en denervación pero con perfil redondeado. La infiltración de tejido adiposo puede estar presente o cambiar de acuerdo a la intensidad en la evolución de la enfermedad.

8.3 Distrofia Muscular de Cinturas

Es una entidad autosómica recesiva, de efectos variables, se puede presentar en cualquier etapa de la vida. Los pacientes presentan dificultad en la marcha y para subir escaleras. La marcha es anormal y presentan postura lórdica, hay incapacidad para incorporarse del suelo (Gowers positivo) y para saltar. La debilidad es variable, y estos pacientes pueden ocasionalmente presentar hipertrofia de las pantorrillas.

La evolución en esta entidad puede ser variable, ya que su progresión puede ser lenta o tener un desarrollo rápido.

Los estudios clínicos muestran un CPK variable, un EMG con patrón miopático. Ocasionalmente se realiza un análisis cromosómico en mujeres para excluir afección en el locus X 21.

La biopsia muscular revela:

Cambios distróficos variables, con variación en el tamaño de las fibras, y la presencia de numerosas fibras partidas. Hay degeneración y regeneración de fibras. También hay proliferación de tejido conectivo y adiposo, muy similares a las distrofias de tipo Duchenne y Becker (Tabla VI), pero la principal característica que suele distinguirla cuando están presentes, son las alteraciones arquitecturales (Tabla VII), que son importantes en esta entidad. Pero en ocasiones hacer el diagnóstico diferencial con distrofias de tipo Duchenne o tipo Becker, suele ser muy controversial, ya que comparten características histológicas muy similares (Arikawa, 1991), y aún más cuando la progresión en la distrofia de cinturas es rápida y severa (fig. 38, 39, 40).

La forma de distinguirla es con la prueba de inmunohistoquímica con anticuerpo antidistrofina, o con el seguimiento del paciente.

Tabla VI

**CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS COMPATIBLES DE
D.M. DUCHENNE Y D.M. CINTURAS**

<u>Características</u>	<u>D.M. Duchenne</u>	<u>D.M. Cinturas</u>
Variación marcada Ø	+	+
Hipertrofia de fibras	+	++
Núcleos interiores	+	++
Atrofia de fibras	+	++
Fibras partidas	+	++
Necrosis	+	+
Fagocitosis	+	+
Fibras basofílicas	++	+
Infilt. Inflamatorio	++	+
Degeneración de fibras	+++	+
Tejido graso	++	+
Tejido conectivo proliferativo	++	+

Tabla VII

CARACTERISTICAS DISTINTIVAS ENTRE
D.M. DUCHENNE Y D.M. CINTURAS

<u>Características</u>	<u>D.M. Duchenne</u>	<u>D.M. Cinturas</u>
Reacción con la ATPasa 9.4	indistinguible	buena
Ø de hasta 200µm	algunas	frecuentes
Alteraciones arquitecturales	apolilladas	apolilladas anulares distorcionadas
Reacción con la distrofina	negativa	positiva



Fig. 38 Fibras arremolinadas (estrellas), con núcleos interiores, frecuentes en distrofia de cinturas, se observa además fibras atróficas y aumento de fibrosis intrafascicular. H-E 400x.

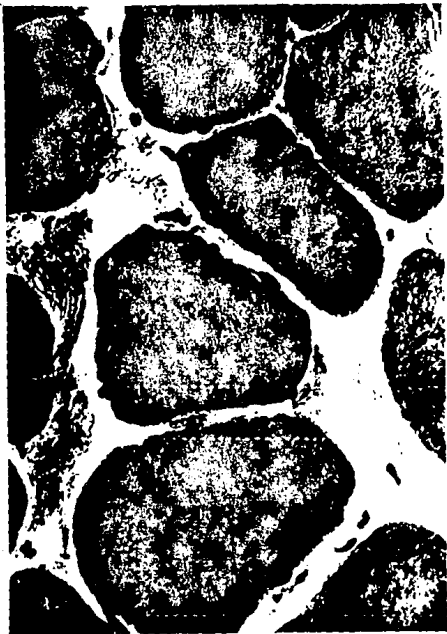


Fig. 39 Fibras hipertróficas con núcleos interiores. Distrofia de cinturas. H-E 800x.



Fig. 40 Otro aspecto distrofia de cinturas, presencia de fibras partidas. NADH-Tr 400x.

8. 4 Distrofia Muscular Facio-Escápulo-Humeral

Es una entidad escrita por Landouzy y Dejerine en 1884. En algunos casos la evolución en esta distrofia puede ser muy variable, ya que en ocasiones presenta un curso leve y de progresión lenta, que llega a permitir una vida normal, en ocasiones puede ser de evolución rápida en las extremidades inferiores que impide la capacidad ambulatoria en la edad adulta.

Generalmente es una entidad con herencia autosómica dominante, pero en ocasiones puede haber casos subclínicos, Afecta a los músculos de la cara y de la cintura escapular. Su edad de desarrollo varía, presentándose en la primera infancia o en la edad adulta. En ocasiones los pacientes observan debilidad del tronco y de la cintura pélvica, y tienen dificultad para la locomoción. Sus signos clínicos son debilidad facial, así como, de la cintura escapular, lordosis, disposición en varios planos en los hombros de la abducción. Pueden presentar sordera, o alteraciones en el fondo de ojo asociados. Generalmente presentan dificultad respiratoria en los últimos estadios. Sus estudios de laboratorio demuestran un CPK normal o ligeramente elevado y un EMG normal o de patrón miopático.

La biopsia muscular nos muestra :

La presencia de fibras atróficas e hipertróficas de ambos tipos, con fibras pequeñas angulares, en ocasiones puede haber predominio de alguno de los tipos de fibras, y en algunos casos los núcleos interiores pueden encontrarse aumentados, con respecto al valor normal. Los cambios degenerativos no son muy marcados, como la presencia de fibras partidas, necrosis, fagocitosis, basofílicas. Se puede observar infiltrado inflamatorio, variando la intensidad, así como la proliferación de tejido conectivo y tejido adiposo. La presencia de fibras apolilladas puede ser frecuente:

8.5 Enfermedades de la Neurona Motora Baja

Las enfermedades de la neurona motora baja, o trastornos hereditarios de los nervios periféricos son un gran número de enfermedades clínicas, que se encuentran afectadas en la neurona motora baja, pueden ocurrir aisladamente, o en otros casos puede encontrarse asociadas con partes del sistema nervioso central, clínicamente se pueden clasificar por la distribución de la debilidad, la progresión de la enfermedad, los aspectos genéticos o por conocimiento de los factores etiológicos.

En algunas ocasiones las atrofiaciones neurogénicas se pueden encontrar mimetizando patrones clínicos, de algunas distrofias o miopatías. por lo que en ocasiones no es posible dar un diagnóstico definitivo o clínicamente determinar la enfermedad.

Los cambios observados en la biopsia de músculo muestran un patrón, recurrente en los síndromes neurogénicos, que son característicos, y ayudan al diagnóstico.

En algunos casos los núcleos presentan forma tigroide, y que en estado de atrofia neurogénica forman grupos de núcleos picnóticos. En ocasiones el nervio motor sustituye a algunas fibras musculares, resultando fibras atróficas dispersas o al azar, cuando las fibras atróficas se agrupan, el tamaño del grupo, se encuentra relacionado con la severidad de la denervación (fig. 41, 42, 43). La presencia de grupos grandes o pequeños es patognómico de denervación, así como lo son la presencia de fibras atróficas aisladas de forma angulada, que se localizan entre fibras de tamaño normal (fig. 44, 45, 46, 47).

De esta misma forma la presencia de grupos del mismo tipo son patognómicos de reinervación, lo que indica que la denervación se encuentra asociada a reinervación (fig. 48, 49), lo que nos da idea del pronóstico y de que tan crónico es el proceso.

La presencia de fibra en "diana" es otro de los cambios que se observan en las denervaciones.

Como lo hemos mencionado estas enfermedades forman un grupo complejo y heterogéneo de trastornos genéticos, que tiene en común su presentación clínica, con debilidad muscular que afecta a los músculos distales de brazos y piernas.



Fig. 41 Grupos de fibras atróficas, con perfil angulado y redondeado, característico de procesos denervativos. H-E 800x.



Fig. 42 Grupos de fibras atróficas, con perfil angulado (*), grupos de núcleos picnoticos (flecha abierta), fibras partidas (flechas negras), alteraciones características de denervación. H-E 800x.

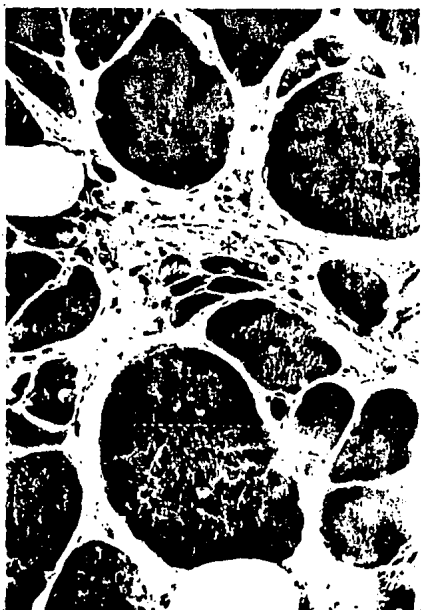


Fig. 43 Aspecto de los grupos de fibras atróficas (*), y núcleos interiores (flechas), en denervaciones. T. Gomori, 800x.

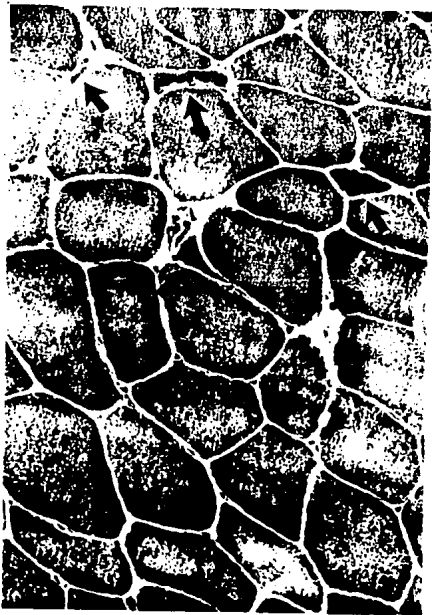


Fig. 44 Fibras pequeñas angulares, características de denervación. T. Gomori, 400x.

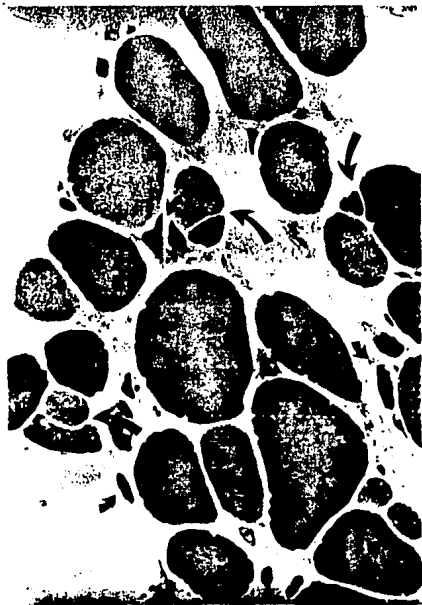


Fig. 45 Delimitación clara de la forma y del tipo, en fibras pequeñas anguladas (flecha pequeña), y señalamiento de fibras que han tenido partición (Flechas grandes). Denervación ATPasa 9,4 800x.

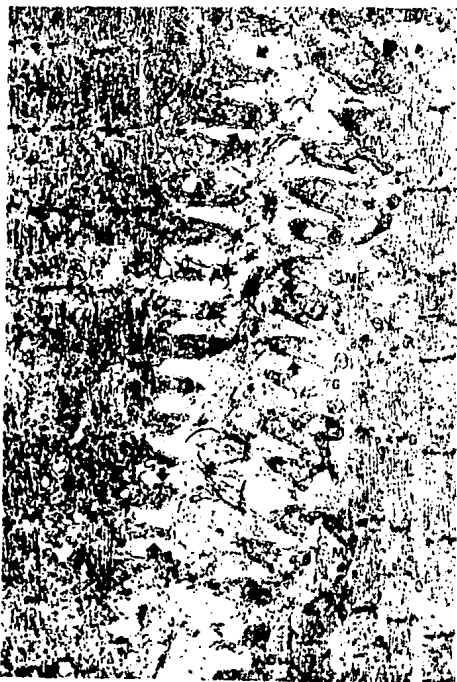


Fig. 46 Plegamiento de la membrana basal en la perifería de 2 fibras atróficas. Corte longitudinal, con apariencia de cierre. Mitocondrias (M) glucógeno (G). Acetato de uranilo / citrato de plomo 28 437x.



Fig. 47 Plegamiento de la membrana basal en fibras atroficas, el plegamiento es menos marcado que en el anterior, por la condición menos atrofica de la fibra. Mitochondrias (M) Corte longitudinal. Denervación Acetato de uranilo /citrato de plomo 28 437x.



Fig. 48 Grupos de fibras del mismo tipo, característico de denervación y reinervación. ATPasa pH. 9,4, mostrando una sola fibra de tipo 2 en toda la muestra. 400x.

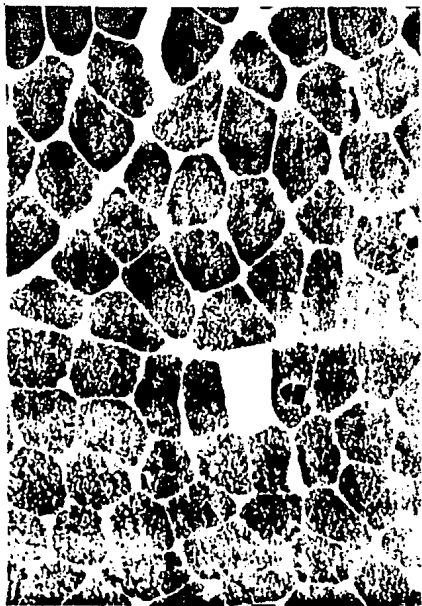


Fig. 49 Grupos de fibras del mismo tipo, reacción inversa a la figura anterior con ATPasa pH 4.3. Denervación y reinervación. 400x.

Se han diferenciado tipos desmielinizantes, con rasgos histológicamente característicos y con disminución en la velocidad de conducción asociada al tipo neuronal. Otro tipo observado también neuronal, es el que presenta atrofia neuronal y mielina normal en el corte histológico, los nervios tienen velocidad de conducción normal.

Estas formas suelen heredarse como autosómicas dominantes, aunque también pueden ser autosómicas recesivas o ligadas al cromosoma X, de características semejantes.

Una tercera entidad se ha identificado como una neuropatía desmielinizante, de tipo autosómico recesiva (Dejerne Sottas), es de desarrollo temprano y más grave que el tipo desmielinizante dominante.

Las formas desmielinizantes como las neuronales pueden ser dominantes o recesivas y puede haber loci múltiples para cada una de ellas.

La clasificación de Dyck y Lambert Las ubica de la siguiente manera (Dubowitz 1992)

Neuropatía sensitiva motora hereditaria (NSMH)

- NSMH 1 desmielinizante dominante (Charcot-Marie-Tooth)
- NSMH 2 neuronal dominante (ELA)
- NSMH 3 desmielinizante recesiva (Neuropatía simple)

8.6 Atrofia Muscular Espinal

Las atrofas musculares espinales constituyen un grupo de alteraciones determinadas genéticamente en las que se registra degeneración de las células del asta anterior de la médula espinal con debilidad asociada de los músculos. En los niños cobra gran importancia por la implicación genética asociada, donde el cromosoma 5 es el que se encuentra afectado, y para cada una de las diferentes atrofas el locus es el que cambia. La prevalencia de esta entidad es de 1:200 000 nacimientos (Gordon, 1991). La debilidad que muestran estas entidades suele ser simétrica, y afectan más a las piernas que a los brazos y más a los músculos distales que a los proximales.

Una forma de clasificación sencilla, y que podría considerarse arbitraria, se basa en la capacidad del niño para permanecer sentado, sin ayuda. (Dubowitz 1992)

1. Grave o Werdnig-Hoffman: incapaz de mantenerse sentado sin ayuda
2. Intermedia: capaz de mantenerse sentado, incapaz de sostenerse de pie o caminar
3. Leve o Kugelberg-Welander: capaz de sostenerse en pie y caminar sin ayuda

La que nos ocupa es la leve o Kugelberg-Welander. Descrita por estos dos investigadores que dan su nombre a la enfermedad en 1954. Es una enfermedad autosómica recesiva. Donde se pueden observar fasciculaciones en la lengua, marcha anserina, signo de Gowers positivo, y puede haber hipermotilidad de articulaciones. Los cambios más frecuentemente observados son los que podemos encontrar en algunas entidades de tipo neuropático, como son la presencia de grupos de fibras del mismo tipo, los cuales en esta entidad suelen ser grandes, teniendo la siguiente distribución fibras atróficas especialmente de tipo 2, e hipertróficas de tipo 1 en especial. Los husos neuromusculares suelen encontrarse prominentes (fig. 50, 51, 52).



Fig. 50 Panorámica de las fibras musculares en atrofia muscular espinal, con grupos de fibras hipertróficas (estrellas) entre grandes grupos de fibras atróficas (triangulos). H-E 200x.



Fig. 51 Aspecto de la reducción de los fascículos, con prominencia del tejido conectivo perifascicular, en atrofia muscular espinal. T. Gomori 200x.

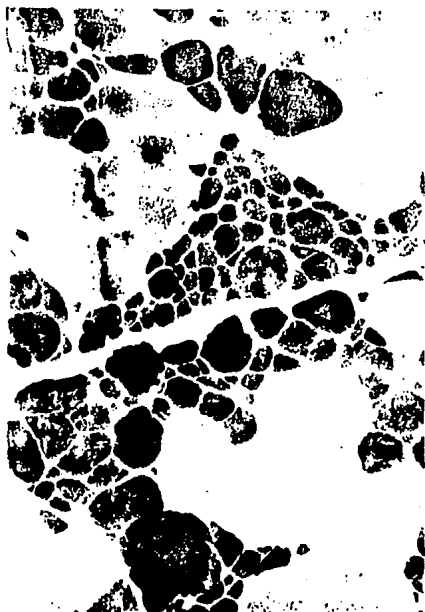


Fig. 52 Grandes grupos de fibras atróficas de tipos 2, y grupos de fibras hipertróficas de tipo 1. Atrófia muscular espinal. ATPasa pH 9.4 400x.

8.7 Síndromes Miotónicos

8.7.1 Miotonía Congénita (Enfermedad de Thomsen)

Fue descrita por Thomsen en 1876, con un estudio en 20 miembros de una familia (Streib, 1987). Es una enfermedad hereditaria de carácter dominante o recesivo, cuyo cuadro predominante es la miotonía, que es un estado de relajación retardada tras una contracción sostenida, puede presentarse además por ejercicio continuo o donde se presente fatiga muscular, físicamente se puede manifestar por el retraso en abrir la mano o en liberarla de asir un objeto. Se puede presentar desde el nacimiento hasta la infancia. Hay rigidez tras períodos prolongados de reposo o actividad sostenida, hay rigidez e inmovilidad al andar, rigidez con el clima frío, dificultad para soltar objetos. Los signos clínicos es miotonía tras cerrar la mano o los ojos, miotonía en la percusión de lengua, eminencia tenar o de otros músculos e hipertrofia muscular. Se puede encontrar asociada a Miotonía después de sensación de miedo o repentina tensión muscular, debilidad persistente en algunos casos. La evolución de estos pacientes es buena en general, pueden con frecuencia controlar la miotonía y la tendencia es a mejorar con el tiempo. El EMG muestra descargas miotónicas características. El diagnóstico es esencialmente clínico.

La biopsia muscular puede ser normal o arrojar datos no específicos, los únicos cambios ocasionales son la ausencia total de fibras del tipo 2B, en la ATPasa 4.6, también se puede presentar hipertrofia de las fibras

Hay también miotonía congénita autosómica de tipo recesivo, donde el paciente muestra debilidad marcada, tanto en miembros como en cuello, pueden estos pacientes observar hipertrofia de algunos músculos (Miller, 1992). Así como contracturas musculares. Esta entidad puede tener afectación severa en el paciente (Sun, 1983). Y en estos casos la biopsia muscular observa: Variación anormal del diámetro de las fibras musculares, con fibras atróficas e hipertroficas, hay fibrosis intersticial e intrafascicular, puede observarse infiltración adiposa y encontrarse alteraciones estructurales tales como fibras en anillo

8.7.2 Distrofia Miotónica

Este síndrome es de tipo dominante, con heterogeneidad y se encuentra en el gen localizado en el brazo largo del cromosoma 19. Este síndrome pertenece a los miotónicos por lo que hay presencia de miotonía, además hay debilidad muscular, emaciación, cataratas, calvicie prematura, cardiopatía con defectos de conducción, atrofia gonadal, déficit intelectual variable y demencia. Puede iniciarse en la infancia, aunque generalmente en la adolescencia o en la edad adulta, o también se identifica en cualquier edad en las familias de alto riesgo.

Los síntomas son debilidad y rigidez, los signos clínicos son miotonía voluntaria con asistimiento sostenido, miotonía de percusión de la lengua o de los músculos periféricos, debilidad facial, ptosis. Hay cuadros asociados como las cataratas o retraso mental.

Durante la niñez los pacientes pueden ser asintomáticos y desarrollar la enfermedad en la edad adulta, la gravedad es variable, incluso dentro de la misma familia, el pronóstico depende de la posible aparición de cardiopatías o problemas respiratorios. El EMG tiene patrón miotónico y/o miopático.

La biopsia muscular reporta alteraciones distróficas, múltiples núcleos interiores, que en ocasiones forman largas cadenas y masas sarcoplásmicas, hay fibras en anillo ocasionales o abundantes. Hay la presencia de fibras pequeñas angulares, las fibras de tipo 1 suelen ser más pequeñas que las tipo 2, aunque éstas también pueden presentar hipertrofia, hay generalmente hipertrofia de fibras T2. Puede haber grupos de núcleos picnóticos, o signos de degeneración ocasionalmente (fig. 53).



Fig 53 Imagen característica de distrofia miotónica, con aumento de núcleos interiores, fibras atróficas e hipertróficas, y grupos de núcleos picnóticos (flechas) H-E 800x.

8.8 Miopatías Congénitas

Las miopatías congénitas son un grupo de enfermedades que se caracterizan por un cambio estructural específico en el músculo, clínicamente se presentan de modo inespecífico con flácidez del niño, bien en el nacimiento o en la infancia o con debilidad más tardía.

Entre algunas mencionaré las siguientes:

8.8.1 Miopatía de Corazones Centrales

Es descrita por Shy y Magee en 1956, la describen como una miopatía progresiva, con patrón dominante que afecta a varias generaciones de la misma familia y se puede presentar entre los 2 y los 65 años. Los pacientes pueden presentar hipotonía, o retraso motor en la infancia. La debilidad afecta a los músculos próximos más que a los distales, y más a las piernas que a los brazos, puede presentarse escoliosis, dislocación de cadera o deformidad en los pies (Shuarb, 1987). En adultos se asemeja a la polimiositis. El defecto genético se ha relacionado al cromosoma 19 (Haan, 1990). La enfermedad parece resultar de alteraciones en la síntesis proteica, durante el estadio temprano de la miogénesis (Fidzianska, 1984). Estos pacientes cursan con hipertermia maligna (Krivasic, 1989) y en ocasiones pueden cursar con hipotonía neonatal. La miopatía de corazones centrales puede tener expresividad variable en la misma familia.

Histológicamente se caracteriza por la presencia de los corazones centrales, en las técnicas oxidativas, se aprecian como áreas redondas, homogéneas e incoloras a la técnica, pueden ser centrales o periféricas y se localizan especialmente en las fibras de tipo 1 (fig. 54).

Al microscopio electrónico se observa que estas áreas que representan a los corazones centrales, pueden ser estructurados o no estructurados. En los estructurados hay discontinuidad de las bandas I, y A, así como el acomodo en zigzag de las bandas Z. Las sarcomeras tienen periodicidad más corta, cuando se comparan con el tejido muscular adyacente. Los corazones no estructurados pierden totalmente el arreglo de las bandas A, I, Z, las cuales no son distinguibles. En ambos tipos la virtual ausencia de mitocondrias y del retículo sarcoplásmico en la región del corazón es característico (fig. 55, 56).

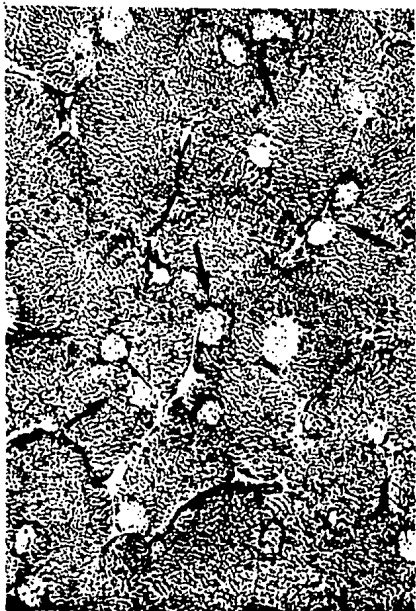


Fig. 54 Fibras musculares con corazones centrales, los cuáles se encuentran hacia la perifería de la fibra. NADH-TR 400x.



Fig. 55 Corazón central (Cc) de tipo estructurado, se aprecia la desorientación e irregularidad de la línea Z (z), aún se distingue el patrón de las sarcómeras, no se observan mitocondrias en esta área. Corte Trasversal. Acetato de uranilo / citrato de plomo 42 327x.



Fig. 56 Disrupción de las sarcómeras en un corazón central estructurado, donde se pueden apreciar algunas triadas (tr), y componentes del sistema T (T) hay total ausencia de mitocondrias. Acetado de uranilo / citrato de plomo 51 763x.

8.8.2. Miopatía Nemalínica

Es descrita por Shy et al en 1963, como una nueva miopatía congénita, que se puede presentar en niños floppy, que tienen mayor debilidad en los músculos de las cinturas superiores que en las inferiores. Puede ser una enfermedad con casos esporádicos, pero en ocasiones puede tener una herencia dominante. Estos pacientes pueden presentar daño severo en la musculatura respiratoria la cuál puede tener progresión leve (Sasaki, 1990). Puede afectar además músculos del diafragma y cardíacos, así como provocar deformidades como la xifosis o escoliosis (Cunliffe, 1985).

La biopsia aparentemente no muestra anormalidades. La observación de los cuerpos nemalínicos se puede hacer en ocasiones desde la hematoxilina-eosina, pero en donde se puede observar mejor es en el tricrómico de Gomori, ya que estos cuerpos tienen un color rojo que resalta sobre el verde-azul que tiñe la fibra muscular, estos cuerpos tienden a estar selectivamente en las fibras de tipo 2, o en ambos tipos (fig. 57).

En el microscopio electrónico se observa que son estructuras densas, con forma rectangular, con un patrón como enrejado de periodicidad constante, y que continua con la banda Z. Por lo que son depósitos anormales del material de la banda Z probablemente de una proteína natural que podría ser la alfa-actina (Morris, 1990) (fig. 58, 59, 60).



Fig. 57 Presencia de cuerpos nemalínicos en color rojo dentro las fibras musculares. *Miopatía nemalínica T. Gomori 200x.*



Fig. 58 Grupo de cuerpos nemalínicos (N) cercanos a las sarcómeras, con orientación transversal (t) y longitudinal (l), corte longitudinal, Acetato de uranilo / citrato de plomo 13 200x.



Fig. 59 Grupos de cuerpos nemalínicos (N), en posición subsarcolemal, lámina basal (LB), en la cercanía de 3 fibras musculares. corte longitudinal. Acetato de uranilo / citrato de plomo 17 208x.



Fig. 60 Corte transversal de un grupo de cuerpos nemalínicos (N), mostrando la estructura cuadrículada. Miopatía Nemalínica. Acetato de uranilo / citrato de plomo 34 320x.

8.8.3 Miopatía con Agregados Tubulares

Los agregados tubulares han sido observados en fibras musculares de casos de parálisis periódica hiper o hipocalémicas, así como en algunas miopatías mitocondriales, por abuso de las drogas, y en ocasiones se encuentra sin relación a alguna de estas entidades.

Los pacientes que cursan con esta miopatía refieren disminución en la fuerza muscular, principalmente en miembros inferiores y a nivel proximal, esta debilidad es progresiva. Estos pacientes tienen mejoría con el tratamiento de esteroides (Gilchrist, 1991).

Histológicamente observamos:

Variación ligera en el diámetro de las fibras musculares, con alteraciones arquitecturales de las fibras, especialmente en las tipo 2, con marcado material subsarcolemal, que cambia de color e intensidad con las diferentes técnicas histoquímicas (fig. 61, 62, 63).

Bajo microscopía electrónica, los agregados tubulares son estructuras con aspecto en panal, y de borde nítido, resultantes del conglomerado de ductos de 50 a 80nm de diámetro externo y de 45 a 70nm de diámetro luminal. Se localizan especialmente en fibras de tipo 2 y parecen originarse del retículo sarcoplásmico (fig. 64).

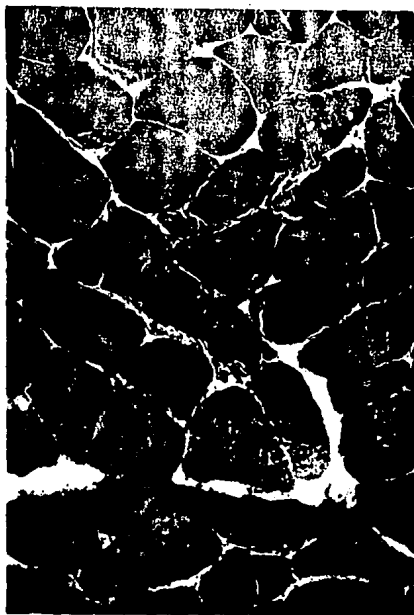


Fig. 61 Aspecto por microscopia óptica de las fibras con agregados tubulares en H-E, 400x.



Fig. 62 Areas oscuras, con alta capacidad oxidativa donde se localizan los agregados tubulares, en la periferia de las fibras . NADH-TR 400x.



Fig. 63 Localización en la perifería de área no reactivas, con agregados tubulares en ATPasa pH 9.4 400x.



Fig. 64 Agregados tubulares (AT), rodeados de miofilamentos (M), donde se aprecia la forma en panal de estas estructuras, con su doble pared. Miopatía por agregados tubulares. Corte trasversal. Acetato de uranilo / citrato de plomo 46 389x.

8.9 Miopatías Mitocondriales

En este tipo de miopatías se producen cambios estructurales de las mitocondrias en asociación con anomalías detectables o presumibles de su función metabólica.

Según la clasificación de Morgan-Huges (Dubowitz 1992) se toma en cuenta la deficiencia bioquímica:

1. Deficiencias del sistema carnitina acilo-carnitina portador (incluye las deficiencias de carnitina muscular y sistémica)
2. Defectos en la utilización del sustrato mitocondrial (incluye diferentes enfermedades con encefalopatía predominante)
3. Defectos en la cadena respiratoria (incluye deficiencias de citocromo y citocromo oxidasa)
4. Defectos de conservación de la energía y de transducción.

Los signos clínicos incluyen debilidad proximal de las extremidades inferiores, cursan con ptosis, oftalmoplegia, debilidad facial leve, retinopatía pigmentaria. Se puede asociar a síndrome oculocraneosomático, bloqueo cardíaco, fatiga muscular, calambres inducidos por el ejercicio, debilidad o mioglobinuria y los síndromes del niño flácido y de disfunción cerebral. Genéticamente, la mayoría de las enzimas mitocondriales son codificadas por el DNA nuclear y su herencia se regula generalmente por un mecanismo autosómico recesivo. No obstante algunas se desarrollan a partir de mutaciones en el DNA mitocondrial, que presenta herencia materna. Así las alteraciones pueden transmitirse solo a través de madres a hijos. El nivel de CPK se puede encontrar normal.

Otros síndromes neurológicos asociados con miopatía mitocondrial:

MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica, episodios tipo ataque)

MERRF (epilepsia mioclónica, fibras rojas rasgadas)

La biopsia muscular muestra:

Una anomalía mitocondrial se sospecha en la observación al microscopio óptico, por la presencia de fibras rojas rasgadas con el tricrómico de Gomori, o por fibras granulares muy reactivas en reacciones enzimáticas como la NADH-TR (fig. 65, 66).

Al microscopio electrónico, la anomalía se confirma al apreciar un número excesivo de mitocondrias de tamaño y forma anormal, modelos inusuales de crestas e inclusiones cristalinas u osmofilas en posición central (George, 1993), aunque no sean patognómicas de esta entidad (fig. 67, 68, 69).

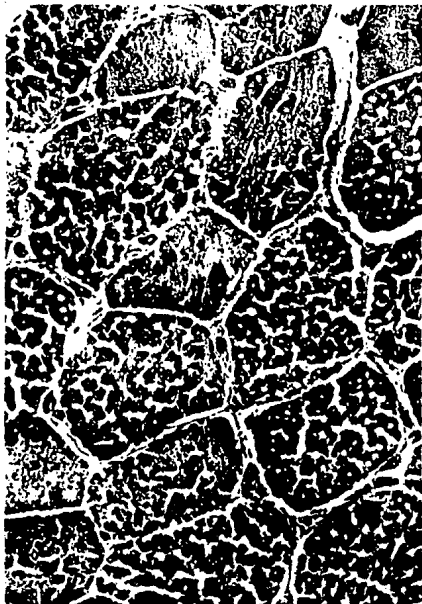


Fig. 65 Fibras rojas rasgadas (flechas), características de miopatías mitocondriales. T. Gomori 800x.

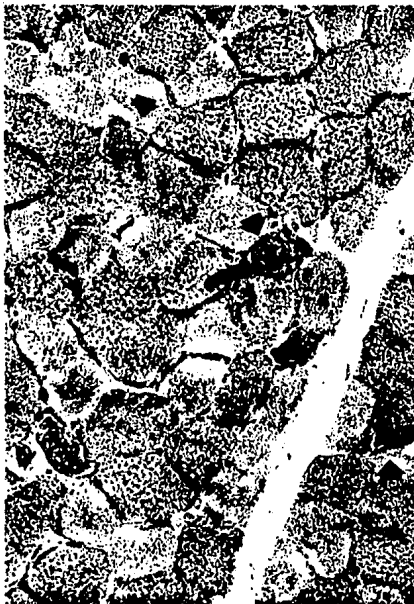


Fig. 66 Aspecto de las fibras rojas rasgadas en NADH-TR. Miopati mitocondrial. 400x.



Fig. 67 Mitochondrias anormales con cristales de inclusión rectangulares, en uno (Cs) o varios grupos (Cg) en una misma mitocondrial. Glucógeno (G). Corte transversal Miopatía mitocondrial. Acetato de uranilo / citrato de plomo 31 200x.



Fig. 68 Mitochondrias anormales con cristales concéntricos (Ma), vacuolización de las mitocondrias anormales (Mv). Corte transversal. Miopatía mitocondrial. Acetato de uranilo / citrato de plomo.



Fig. 69 Mitochondrias aumentadas en número y en tamaño (M), Glucógeno (G), Miofilamentos (m). Miopatía mitocondrial. Corte Transversal. Acetato de uranilo / citrato de plomo 34 250x.

8.10 Miopatía por Deficiencia de Carnitina

La carnitina es necesaria para la producción de energía, por la oxidación de la cadena larga de las grasas, puede haber frecuentes decrementos a estos niveles que se encuentran relacionados con algunas enfermedades neuromusculares (Czyzewsky, 1984).

Los pacientes pueden cursar con hipotonía generalizada durante los primeros años de vida y posteriormente desarrollar debilidad muscular progresiva, que dificulte su función motora así como dificultad en la alimentación. Los EMG pueden presentar un patrón normal, el CPK y el lactato piruvato se pueden encontrar elevados. Se ha observado que una pequeña cantidad de carnitina, permite la regeneración muscular.

La biopsia refleja en microscopía óptica, afectación excesiva de las fibras, tales como partición de las fibra , proliferación de tejido conectivo. Se aprecia aumento de enzimas oxidativas, glucógeno y lípidos (fig. 70, 71). En microscopía electrónica se observa exceso de lípidos y mitocondrias anormales (fig. 72). Estos pacientes pueden presentar infecciones respiratorias y tener afecciones cardíacas que, incluso pueden llevarlos a la muerte



Fig. 70 Localización de lípidos dentro de las fibras musculares, en una miopatía por deficiencia de carnitina. Rojo Oleoso 800x.

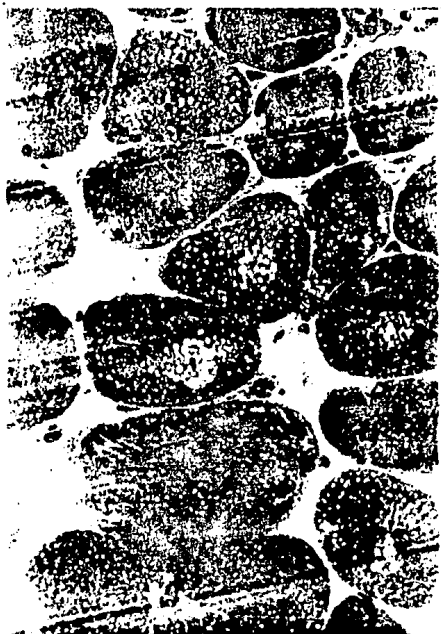


Fig. 71 Aspecto de cuerpos lipídicos, en corte de 1 μ m, en las fibras musculares. Deficiencia de carnitina. Azul de toluidina, 800x.

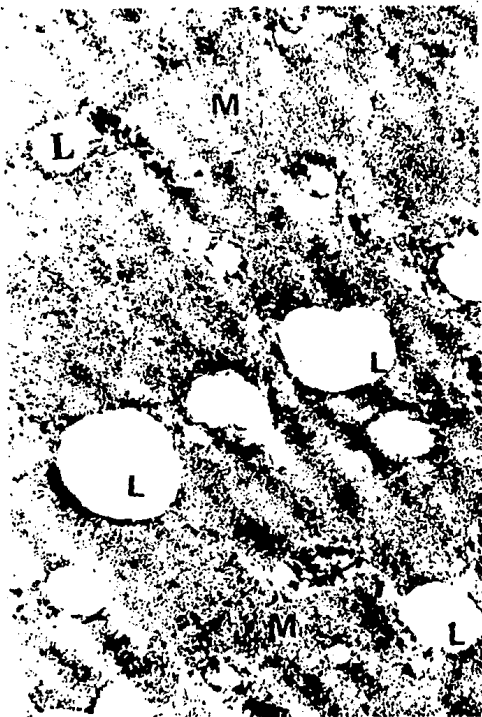


Fig. 72 Acúmulo de lípidos (L) entre las miofibrillas, con bordes bien delimitados. Corte transversal. Miofilamentos (M) . Deficiencia de Carnitina. Acetato de uranilo / citrato de plomo 34 570x.

8.11 Distrofia Muscular Oculofaríngea

Es una enfermedad de herencia autosómica dominante, que reportó E. W. Taylor (Taylor, 1915). y que fue descrita por primera vez por Shy y Magee, en una familia francesa y en sus descendientes en el Canadá, principalmente en el área de Quebec, actualmente se ha reportado en otros grupos étnicos, como son los japoneses, los hispanoamericanos de Nuevo México, Arizona, así como en familias de España y de Noruega, que no pertenecen a la descendencia francesa portadora.

Estos pacientes presentan ptosis palpebral progresiva, disfagia, los músculos más afectados son los de los párpados, los faciales, la musculatura faringo-esofágica, así como cambios en la musculatura de los miembros, tanto inferiores como superiores, aunque el paciente no reporte debilidad de estos últimos.

Histológicamente se debe encontrar:

Según los datos reportados por Dubowitz (1). Las vesículas enmarcadas como características patognomónicas de la entidad. Los datos encontrados en pacientes mexicanos fueron: variación en el diámetro de las fibras musculares, núcleos interiores, necrosis, y fibras pequeñas anguladas, no encontramos las vesículas enmarcadas reportadas por Tome et al (Bouchard, 1989) (Tome, 1989) (fig. 73, 74).

Los estudios con microscopía electrónica, realizados por Fardeau y Tome, 1980, reportan inclusiones intranucleares, de naturaleza tubular, en las observaciones realizadas se encontró: alteraciones en el número y en el tamaño de las mitocondrias en posición subsarcolemal, como lo reportado en otros trabajos (Pratt, 1986) (fig. 75). Pero apesar de la búsqueda exhaustiva en todos los pacientes que se recibieron con este diagnóstico no se encontraron este tipo de inclusiones, y la cromatina nuclear se encontró con un patrón de distribución al azar (fig. 76).



Fig. 73 Aspecto de las fibras musculares, en NADH-TR de distrofia oculofaríngea, solo con ocasionales fibras pequeñas de perfil angulado. 400x.

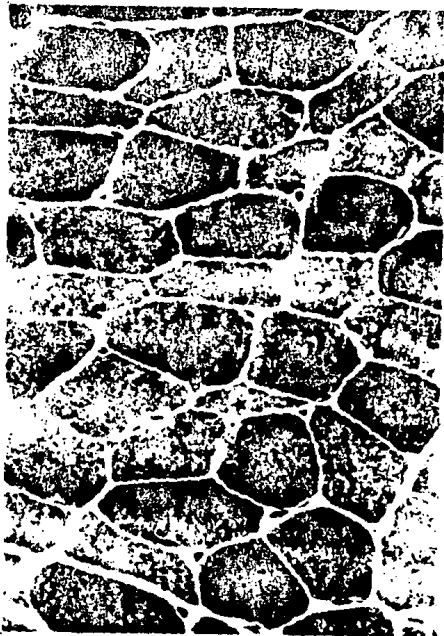


Fig. 74 Ocasionales fibras pequeñas angulares, reportadas para distrofia oculofaríngea, donde no se observan las vesículas enmarcadas que se refieren como patognomónicas de esta entidad. T. Gomori 400x.

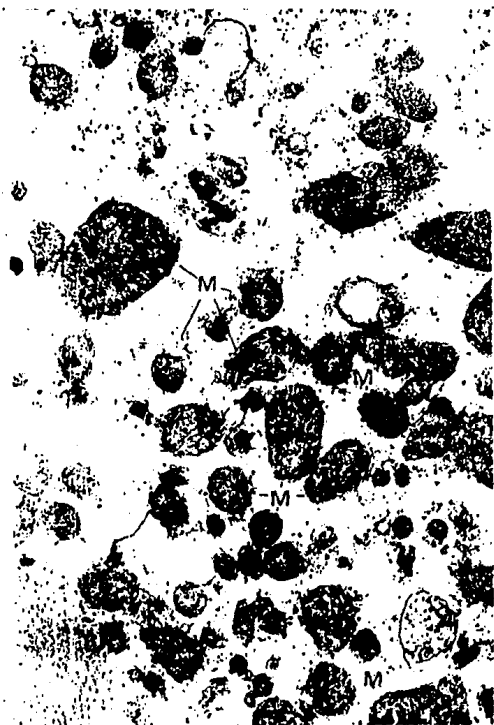


Fig. 75 Corte transversal mostrando alteraciones a nivel de mitocondrias (M), con aumento en número de estas. Miofilamentos (m). Distrofia muscular oculofaríngea. Acetato de uranilo / citrato de plomo 32 254x.



Fig. 76 Corte transversal de músculo, mostrado en el núcleo (N) , distribución normal de cromatina, sin inclusiones nucleares. Glucógeno (G). Miofilamentos (M). Fibras de colágeno (C). Distrofia muscular oculofaríngea. Acetato de uranilo / citrato de plomo 48 000x.

8.12 Polimiositis

Esta entidad clínicamente tiene semejanzas con artritis reumatoide y polimialgia reumática, y en la patología muscular pueden diferir. Se le considera una enfermedad autoinmune, de la que se tienen evidencias de que interviene en la mediación del mecanismo celular, de la patogénesis de la destrucción del músculo (Reid, 1993).

Puede presentarse como una enfermedad aislada, que tiene afectaciones musculares y que en ocasiones puede tener manifestaciones en la piel (dermatomiositis). Pueden encontrarse asociadas a otras enfermedades como enfermedades de la colágena, lupus eritematoso, artritis nodosa.

No tiene una edad de inicio establecida, ya que se puede presentar en la infancia como en la edad adulta, se asocia a sitios como los hombros y la cadera, donde se acompaña con debilidad que puede durar días o semanas. Generalmente la debilidad es proximal y simétrica como en la distrofia de cinturas y tiene distribución variable.

Puede tener una progresión rápida que resta en debilidad severa, tanto, que el paciente puede quedar confinado a una cama, se puede acompañar con hinchazón de los músculos.

En 30 a 40% de los pacientes cursan con dolor muscular, puede haber disfagia asociada, fiebre y el fenómeno de Raynaud, algunos pacientes pueden tener problemas respiratorios por la debilidad de los músculos intercostales. Los niveles de CPK pueden encontrarse variables o elevados, los EMG, tendrán un patrón característico, con combinación de potenciales de fibrilaciones espontáneas, similares a los observados en denervación y polifásicos de corta duración, como en miopatías. Pueden además haber involucramiento cardíaco, con arritmias, o defectos de conducción.

En la biopsia muscular lo que llama la atención, es la presencia de respuesta inflamatoria y la tendencia en la distribución de las fibras atroficas que es perifascicular, así como vacuolas en las fibras musculares; hay variación en el diámetro de las fibras musculares tendientes a la atrofia, hay fibras pequeñas anguladas, puede haber predominio de fibras de tipo 1, los núcleos interiores se pueden encontrar aumentados, se puede presentar el efecto de fibras fantasmas en algunas biopsias, así como la presencia de fibras apolilladas (fig. 77, 78).



Fig. 77 Area de infiltrado inflamatorio, en corte longitudinal. Polimiositis. H-E 800x.

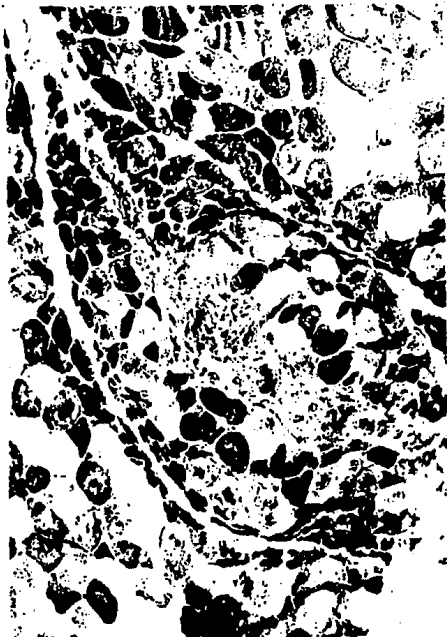


Fig.78 Fibras atróficas perifasciculares, características de polimiositis, NADH-TR, 400x.

8.13 Atrofia de Fibras T 2

La atrofia selectiva de las fibra de tipo 2 muestra anormalidades asociadas con la patología del músculo, y pueden aparecer en gran número de enfermedades en las que se puede relacionar un problema secundario, como son las enfermedades del tracto piramidal, retardo mental (Broke y Engel 1969), enfermedades de la colágena (Engel, 1965) Miastenia gravis (Engel y Mc Farlin 1966) y están presentes como secundarias a desuso, por enfermedad o por postración en cama. También se ha observado en polimialgia reumática y en enfermedad de Parkinson. Por lo que en ocasiones la sola presencia de este tipo como alteración de la biopsia puede implicar inactividad muscular. Esta alteración se considera la más común y menos específica (fig. 79).

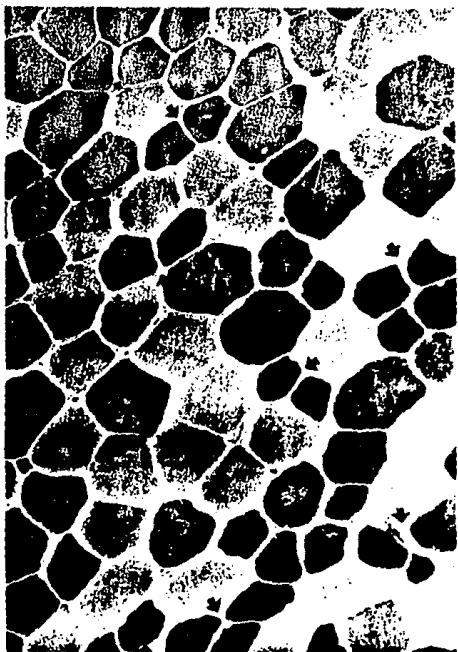


Fig. 79 Disminución del diámetro en ambos tipos de fibras. Atrófia universal de fibras. NADH-TR 800x.

8.14 Atrofia Universal de Fibras

La atrofia universal de fibra es una entidad que se puede encontrar asociada a varias entidades, como cambios secundarios, en la infancia, principalmente tiene su relación con desnutrición y con falta de motilidad del paciente, en algunos casos, a miopatías como las nemalínicas, pero se consideran cambios de tipo secundario (fig. 80, 81).



Fig. 80 Atrófia univeral de fibras, con prominencia de núcleos periféricos y tejido conectivo perifascicular (flechas). H-E 800x.



Fig. 81 Disminución en el diámetro de un gran número de fibras de tipo 2. Atrófia de T2. ATPasa pH. 9.4, 400x.

8.15 Hipertrofia de Fibras

La hipertrofia puede involucrar a ambos tipos de fibras, o estar limitados a un tipo en particular. La hipertrofia de fibras se encuentra relacionado con ejercicio donde la hipertrofia de fibras de tipo 2 es usual, y tanto las fibras de hombres como de mujeres pueden aumentar su diámetro. Los cambios en el diámetro de la fibra no se encuentran involucrados a ninguna patología específica. Por lo que pueden pasar como hallazgos inespecíficos (Dubowitz, 1973) (fig. 82, 83).

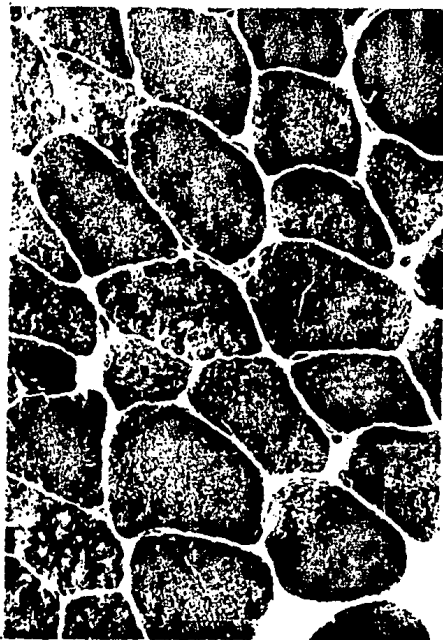


Fig. 82 Fibras hipertróficas con fibras de diámetro normal (cuadro). T. Gomori
400x.



Fig. 83 Fibras hipertróficas, de tipo 1 y 2 (flechas grandes), y fibras de diámetro normal de tipo 2, (flechas pequeñas). ATPasa 94, 800x.

9. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las distrofias son un grupo de enfermedades determinadas genéticamente con degeneración progresiva del músculo esquelético, y pueden subdividirse en base a sus características clínicas y la severidad en la debilidad muscular así como su patrón de herencia.

Un diagnóstico de distrofia muscular clínicamente es suficiente, pero la biopsia muscular toma su importancia en el diagnóstico de algunas entidades, pues pueden tener diferentes evoluciones y pronósticos, a pesar de que, en la mayoría, el tratamiento actual se restringe a medidas para mantener la fuerza muscular, como la fisioterapia.

Con la realización de este trabajo hemos llegado a las siguientes determinaciones:

En cuanto a la realización de la biopsia en un músculo, del cual no se conoce su aspecto morfológico así como el morfométrico, no dejará la posibilidad de dar un diagnóstico adecuado, por que cada músculo del cuerpo tiene una distribución histológica diferente.

Por lo que la discusión con el cirujano antes de la biopsia, acerca del músculo a tomar es importante, para evitar tomar un músculo severamente afectado por la enfermedad, por algún estudio anterior y para tomarse en cuenta el tipo de miopatía en la que se está emitiendo el diagnóstico clínico.

El manejo de la muestra cuando no es bien realizado será igualmente un impedimento para llegar a un diagnóstico. Y los aspectos que deben cuidarse, son los relacionados al traslado del material; ya que el paso del tiempo es determinante para que las reacciones histoquímicas se puedan llevar a cabo. Estas reacciones también se ven afectadas cuando el músculo es transportado congelado con hielo, en este caso la biopsia ha sufrido un congelamiento y descongelamiento previo, que van a influir en la arquitectura del material, y en este caso el material presentará artefactos debidos a congelación.

El hecho de que el material se transporte sin que la gasa esté humedecida en solución fisiológica, también altera la estructura de la muestra. Lo que resalta que la forma de transporte de la muestra es el primer paso de importancia para cuidar que la muestra pueda ser de utilidad.

En el laboratorio la muestra debe de seguir siendo manejada con extremo cuidado, sobre todo en el momento de la congelación que suele ser el punto más trascendente, ya que una mala congelación representa, la pérdida total del material. La congelación debe de hacerse de forma rápida y no pausada, ya que el estar sacando la muestra del nitrógeno para ir verificando su congelación, altera el proceso y propicia la formación de cristales de hielo en la muestra, esto cristales pueden encontrarse en una parte o en toda la muestra.

También las técnicas representan un punto de cuidado sobre todo, en aquellas técnicas donde el pH es factor importante, como en las técnicas de ATPasa, con sus tres pH's correspondientes. Ya que un desajuste en el pH, significa tener reacciones falsas positivas o negativas, como puede ser que las fibras presenten el mismo tono de coloración, o que no se presente el viraje correspondiente a cada reacción.

Una cuestión más es que la biopsia muscular se debe realizar únicamente como último recurso para llegar al diagnóstico, y cada solicitud de estudio para biopsia muscular debe ir acompañada de la historia clínica del paciente con nombre, edad, sexo, así como incluir los resultados de laboratorio, niveles de CPK, aldolasas, y mencionar los niveles de fuerza muscular del paciente, valoración neurológica, antecedentes familiares y el estudio electromiográfico del paciente.

Es importante que antes de realizar la biopsia, se dejen pasar algunos días después de la electromiografía para evitar tener una respuesta inflamatoria en la biopsia; si se va a tomar ésta, del mismo músculo donde se practicó la electromiografía.

Otra de las cuestiones importantes es que no debe de tomarse a la biopsia como un estudio de diagnóstico concluyente de una miopatía, por el contrario la biopsia muscular es un estudio más de los realizados, que el paciente debe tener, para determinar el tipo de miopatía involucrada, y debe ser como se ha mencionado anteriormente el último a realizar.

La biopsia muscular resulta no concluyente, por que en algunas ocasiones la miopatía se encuentra en una etapa muy inicial de la enfermedad o por presentarse en etapa terminal de la misma, estos cambios pueden ser apenas perceptibles o ser tan drásticos que no permiten hacer un diagnóstico determinado.

En mucha ocasiones las muestras presentan cambios que resultan ser inespecíficos, por que no se encuentran acompañados de otras alteraciones características de la enfermedad. Por lo que cabe señalar que ninguno de los cambios ó alteraciones histológicas

por sí solos son considerados patognómicos de ninguna de las entidades. Los cambios en conjunto son los que determinan un diagnóstico. Entonces si éstos en su mayoría no son observados, entonces no es posible interpretarlos como una entidad. Esto es frecuente que ocurra como se ha reportado en el presente trabajo con un 11%.

En cuanto a las cambios observados en microscopía electrónica ocurren, situaciones similares hay cambios que son específicos de las entidades, como son las alteraciones a nivel mitocondrial, o la presencia de otros organelos como son los cuerpos nemalínicos, que sí representan a patologías específicas, pero algunas otras presencias como son los gránulos de glucógeno o las gotículas de grasa en pequeña proporción no son patognómicos de ninguna entidad.

Y sólo a algunas entidades se les hace este tipo de estudio, ya que como se ha descrito en cada una de las entidades, la microscopía óptica es suficiente para hacer el diagnóstico, ya que en la mayoría de las miopatías, se tiene bien caracterizado el patrón de alteración. Y la microscopía electrónica nos sirve para reforzar un diagnóstico.

Por todo lo anteriormente mencionado es entonces necesario que para el mejor conocimiento de las enfermedades musculares en nuestro país, se deba tener una buena valoración clínica del paciente, realizar todos los estudios correspondientes, tanto de laboratorio como electrofisiológicos, antes de solicitar la realización de la biopsia muscular, ya que debido a la falta en ocasiones de alguno de estos estudios, se han indicado biopsias a pacientes que histológicamente resultan normales, como es el caso, del presente trabajo donde el 23% de lo reportado correspondió a este diagnóstico.

Otro de los puntos a mencionar es, que las enfermedades musculares ocurren en todas las edades, tanto a hombres como en mujeres, observándose un cierto predominio en varones, probablemente a que como se ha mencionado ya, algunas de estas miopatías son ligadas al sexo.

También se observó que la infancia es una de las etapas en donde hay mayor ocurrencia, así como la tercera y cuarta década de vida, tanto en hombres como en mujeres, y se observa un patrón similar. Esto puede ser debido a que suele haber enfermedades que empiezan a tener sus primeras manifestaciones en la infancia y que en ocasiones suelen terminar con la vida de los pacientes en este período.

En la segunda y tercera decada de la vida, es cuando los pacientes tienen más acentuados los síntomas y acuden al especialista para tratarse, y en ocasiones reportan inicios desde la infancia o adolescencia, pero sin referir transtornos como los que tienen en ese momento.

10. BIBLIOGRAFIA

Arikawa, E., Hoffaman, E. P., Kaida, M., Nonaka, I., Arahata, K., The frequency of patients having dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population. *Neurology* 41: 1491-1496; 1991.

Bouchard, J. P., Gagne, F., Tome, F., Brunet, D. Nuclear inclusions in Oculopharyngeal muscular dystrophy in Quebec, *Canadian Journal Neurological Sciences*. 16: 446-450; 1989.

Brooke, M. H., & Engel, W. K. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types 2 Diseases of the upper and lower motor neurons, *Neurology (Minneapolis)* 19: 378-393; 1969b.

Brooke, M. H., & Engel, W. K. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types 3. Myotonias, myasthenia gravis, and hypokalemic periodic paralysis. *Neurology (Minneapolis)*, 19, 469; 1969c.

Cunliffe, M., Borrow, F., Anaesthetic implications of nemaline rod myopathy. *Canadian Anaesthesiology Society*, 32/5: 543-547, 1985.

Czyzewky, K., Stern, L. Z., Sadeh, M., Bahl, J. Changes in muscle Carnitine during regeneration. *Experimental Neurology* 86: 73-80; 1984.

Dubowitz, V., Brooke, M. H. *Muscle Biopsy: a modern approach*. W. B. Saunders, & Co. Ltd, Londres, pp. 1973.

Dubowitz, V., Sewry, C. A., Fitzsimmons, R. B. *Muscle Biopsy: a practical approach*. Bailliere-Tindall, Londres, pp. 1985.

Dubowitz, V. *Atlas color. Enfermedades musculares en la infancia*. Mosby-Year Book Wolfe Publishing. England, pp. 1992.

Emery, A. Duchenne Muscular Dystrophy, meryon's disease. *Neuromuscular Disorders*. 3/4: 263-266; 1993.

Engel, W. K. Muscle biopsy. *Clinical Orthopedic*. 39: 80; 1965b.

Engel, W. K., Mc Farlin, D. E., Drews, G. A., Wochner, R. D. Protein abnormalities in neuromuscular disease- Part 1. *Journal of the American Medical Association* 195: 754; 1966.

Engel, W. K., & Brooke, M. H. Histochemistry of the myotonic disorders. In *Progressive Muskeldystrophie, Mictonic*, ed Kuhn, E., p 203 Stuttgart: Springer-Verlag 1966.

Engel, A. G., Banker, B. Q. *Myology. Basic and Cinical*. Mc Graw-Hill Book Company, U. S. A, pp. 1986.

Fidzianska, A., Niebroj., Dobosz, I., Badurska, B., Ryniewlizzs. Is central core disease with structural core a fetal defect? *Journal Neurology*. 231/4: 212-219: 1984.

George, W. F., Svenhormöller, S. Two types of mitochondrial crystals in diseased human skeletal muscle fibers. *Muscle and Nerve* 11: 45-55; 1988.

Gilchrist, J. M., Ambler, M., Agatello, P. Steroid responsive tubular aggregate myopathy. *Muscle and Nerve* 14/3: 233-236; 1991.

Gordon, N. The spinal muscular atrophies. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 33: 930-938; 1991.

Haan, E. A., Freemantle, C.A., Mc Cure, J. A., Friend, K. L., Mulley, J. C. Assignment of the gene for central core disease to chromosome 19. *Human Genetics* 86/2: 187-190; 1990.

Junqueira, L. C., Carneiro, J. *Histología Básica*. 2a. Ed. Salvat Barcelona, 158-60. 1981.

Kakulas, B. A., Adams, R. D. *Diseases of clinical muscle. Pathological Foundations of Clinical Myology*. 4Th ed. Harper & Row Publishers. Philadelphia, pp. 1985.

Krivasic, H. R., Krivosvic, J. Susceptibility to malignant hyperthermia associated with central core disease. *Presse Medical*. 18/16: 828-831; 1989.

Marshall, P. A., Williams, P. E., Goldspink, G. Accumulation of collagen and altered fiber type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in the mdx dystrophic mouse. *Muscle and Nerve* 12 : 528-537; 1989.

Miller, R. G., Buchtal, F. Case-of-the-month: autosomal recessive myotonia congenita: Marked muscle weakness in a 16-year-old-boy. *Muscle Nerve* 15:111-113; 1992.

Morris, E. P., Nneji, G., Squire, J. J. The three dimensional structure of the nemaline rod Z-band *Journal Cell Biology*, 116/6 II : 2961-2978; 1990.

Oertel G. Morphometric analysis of normal skeletal muscles in infancy, childhood and adolescence. An autopsy study. *Journal of the Neurological Sciences*, 88: 303-313; 1985.

Pratt, M. F., Meyers, P. K. Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent ultrastructural evidence for mitochondrial abnormalities. *Laryngoscope* 96: 386-373; 1986.

Reid, R., Heffner, J. R. Inflammatory Myopathies. A review. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 52/4: 339-350; 1993.

Rodin, J. *Histology*. Oxford. University Press, London. Cap. 8 1977

Sasaki, M., Yaneyama, H., Nonaka, I. Respiratory implications of nemaline rod myopathy *Pediatric Neurology*. 6/6: 425-427; 1990.

Shuarb, A., Paasuke, R. T., Brownell, A. K. K. Central core disease. Clinical feature in 13 patients. *Medicine* 66/5: 389-397; 1987.

Sida, E., Romero, V., Teixeira, F. Método sencillo y económico para la preservación óptima de biopsias musculares. *Patología*, 29: 13-15; 1991.

Sida, E., Ridaura, C., Teixeira, F., Miranda, V. A., Romero, D. V., *Manual de histoquímica enzimática para la biopsia muscular*, Edit. SLAP/AMP., México. pp 1993.

Sun, S. F., Streib, E. W. Autosomal recessive generalized myotonia. *Muscle and Nerve* 6: 143-148; 1983.

Streib, E. W., Differential diagnosis of myotonic syndromes. *Muscle and Nerve* 10: 603-605; 1987.

Taylor, E.W. Progressive vagus-glossopharyngeal paralysis with ptosis. A contribution to the group of family diseases. *Journal Nerve and Mental Diseases* 42: 129; 1915.

Tome, F., Fardau, M. Nuclear inclusion in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathological* 49/1: 85-87; 1980

Tome, F., Askanas. V., Engel. W. K., Alvarez, R. B., Lee. C. Nuclear inclusions in innervates cultured muscle fibers from patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. Neurology 39: 926. 1989.

Wilson, A. R. T. Enzyme histochemistry in muscle biopsy. Institute of Medical Technology. Toronto 1984.