

CONTRIBUCIÓN DE LA ANATOMÍA PATOLÓGICA AL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES MUSCULARES

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

***Mercedes García Villanueva
Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. Marzo-2012***

BIOPSIA MUSCULAR

Obtención

- Elección del músculo
- No en sitio de EMG previo ni en inyección de la anestesia
- Músculos preferentes

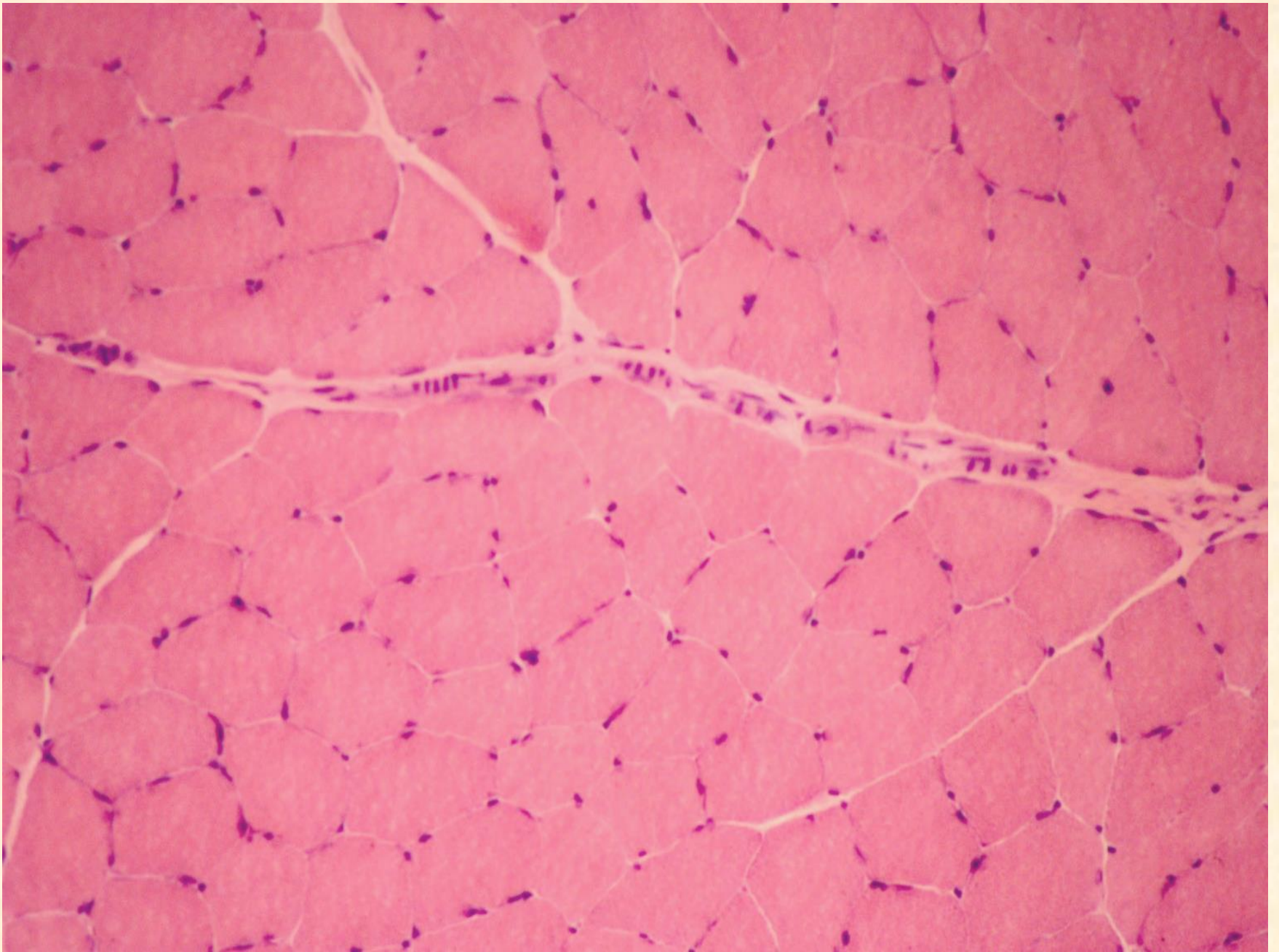
Procedimiento

*Fijación en formol a 10%
Inclusión en parafina*

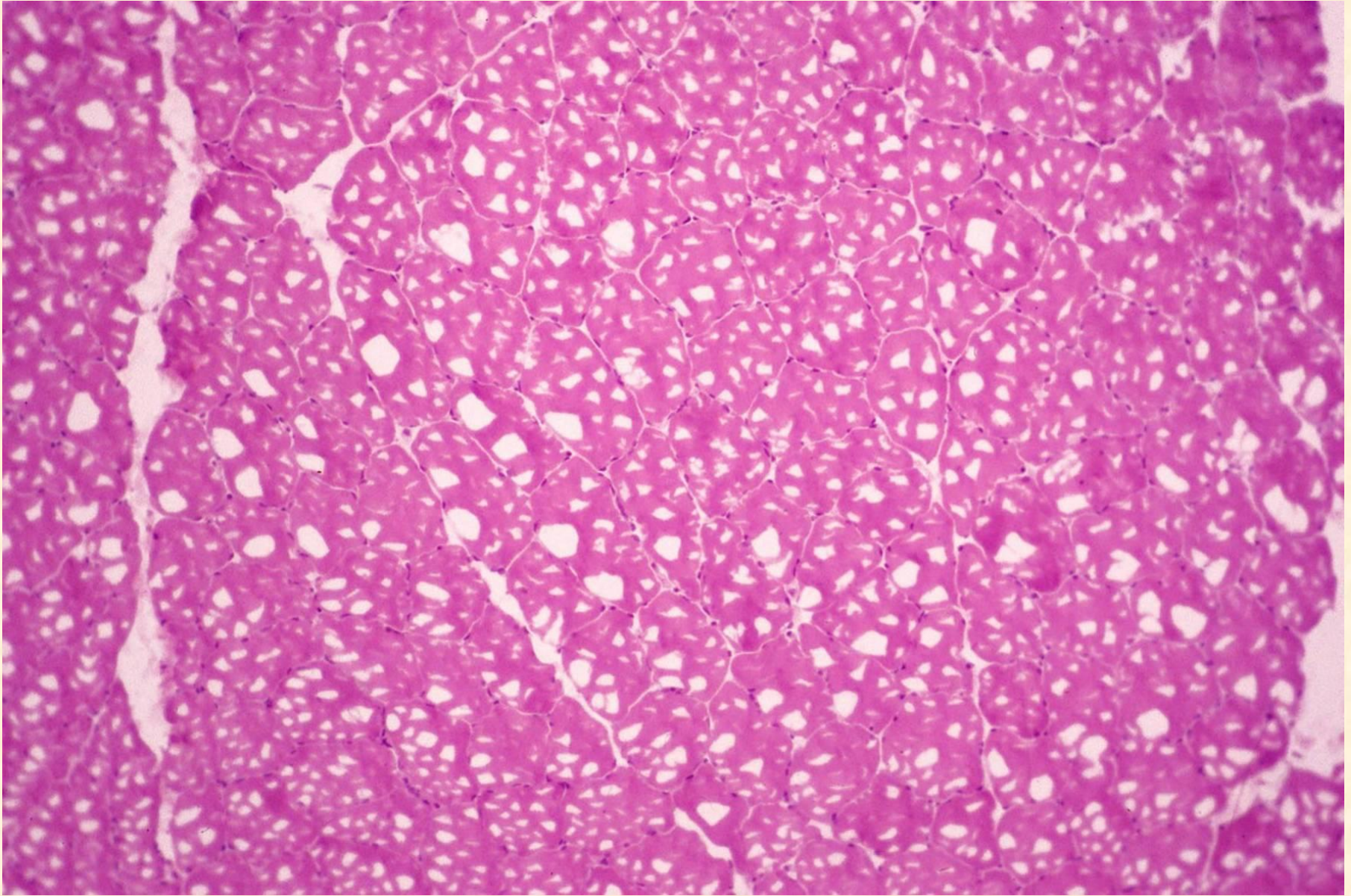
CONGELACIÓN

*Fijación en glutaraldehído
Microscopía electrónica*

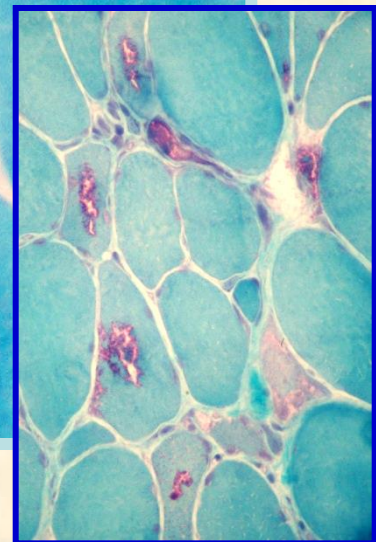
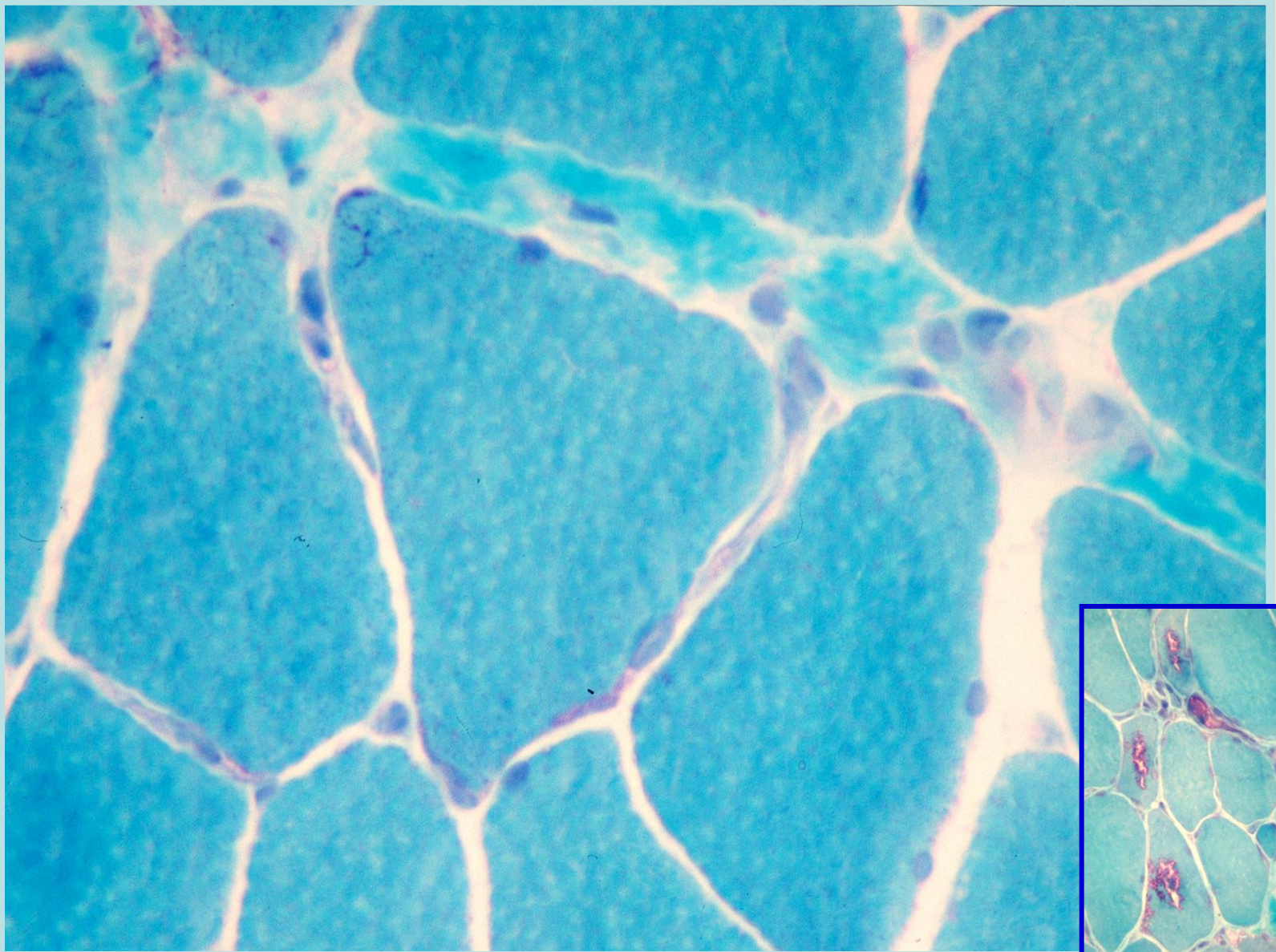
- Histología
- Histoquímica
- Inmunohistoquímica
- Estudios bioquímicos, genéticos y Western blot



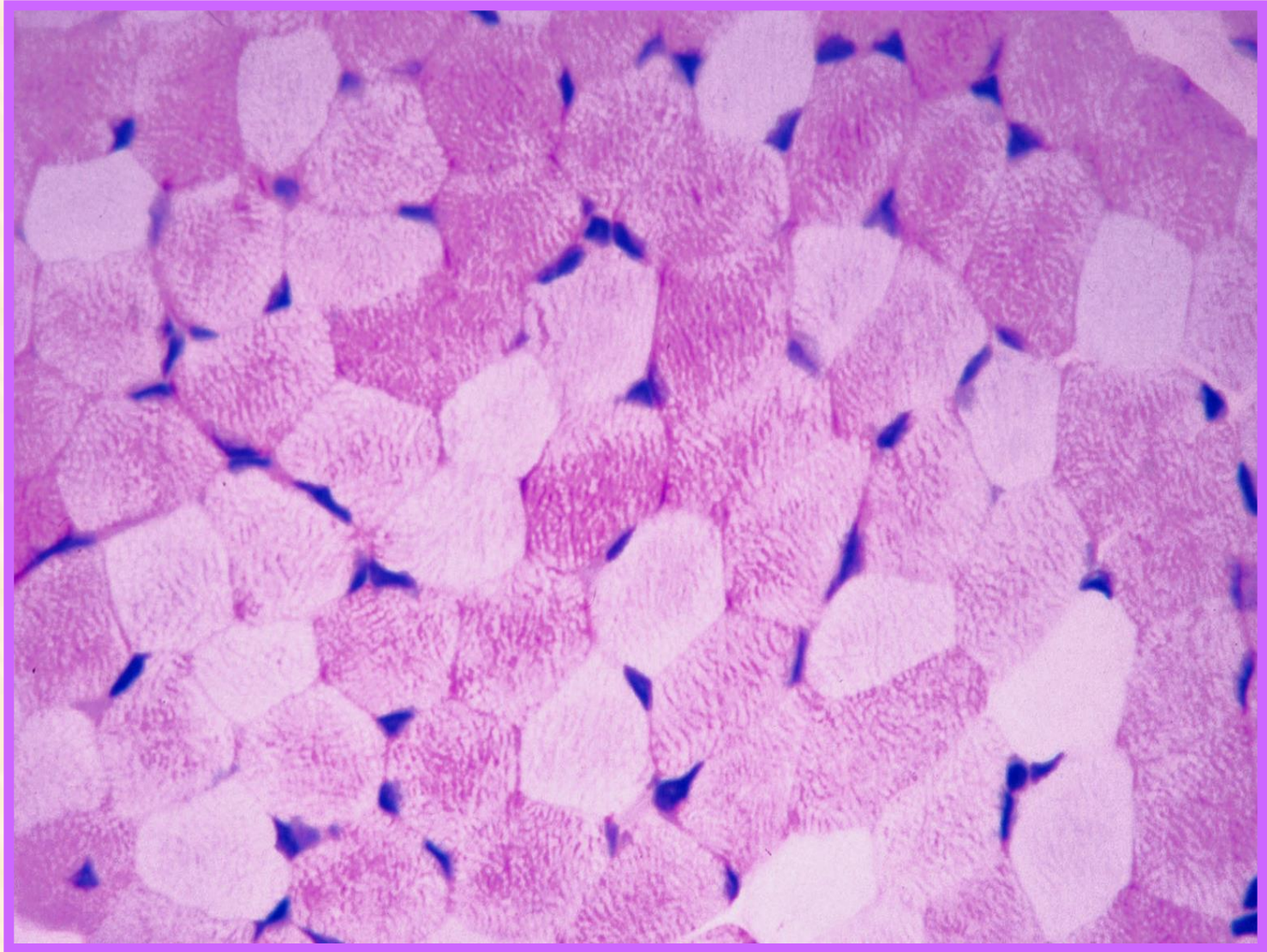
H-E (normal)



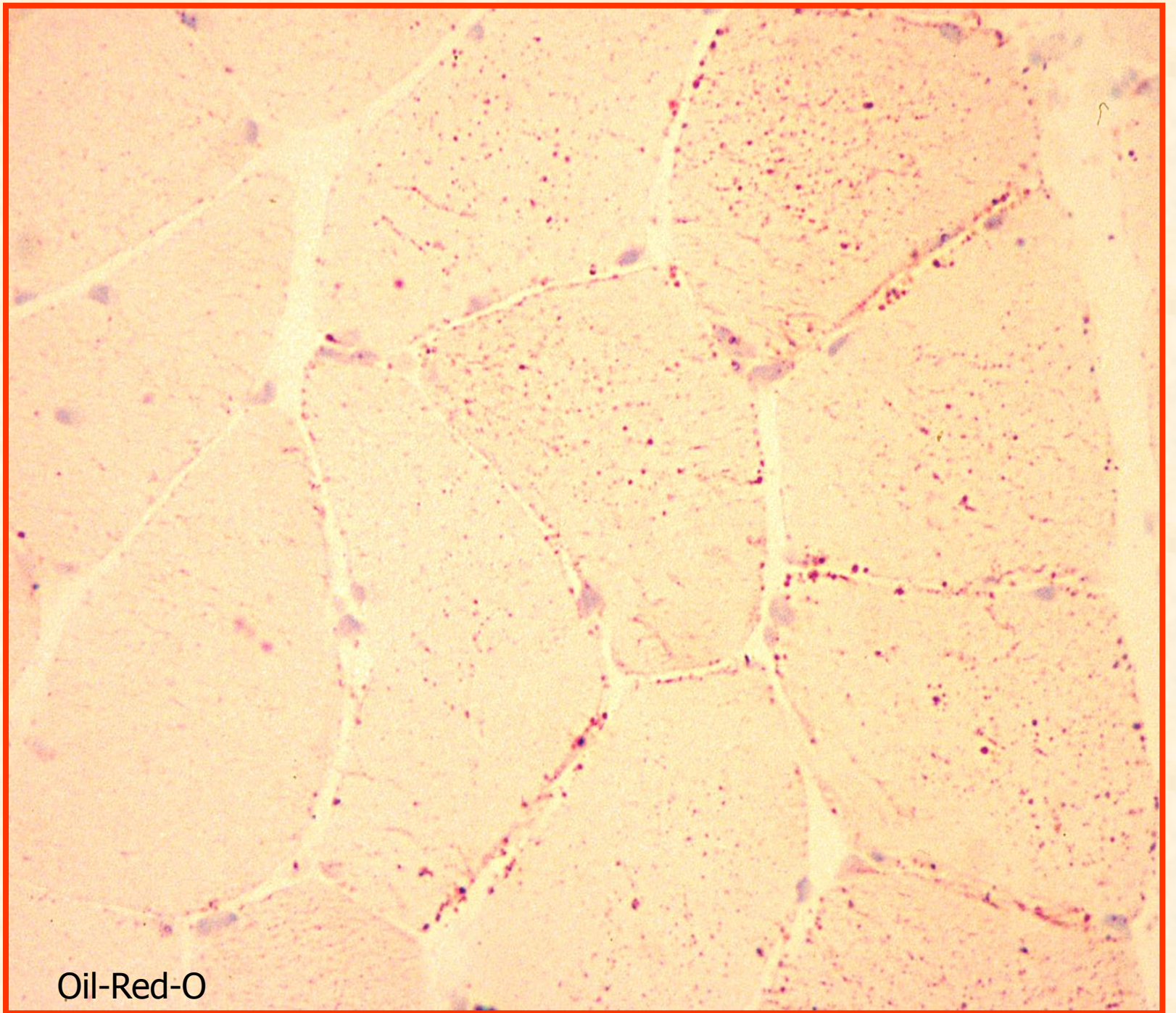
Congelación inadecuada



Tricrómico modificado de Gomori



PAS



Oil-Red-O

TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

■ *Se hacen siempre*

Técnicas de ATPasa (Adenosín-trifosfatasa) a pH 9,4; 4,6 y 4,2.

Técnicas oxidativas:

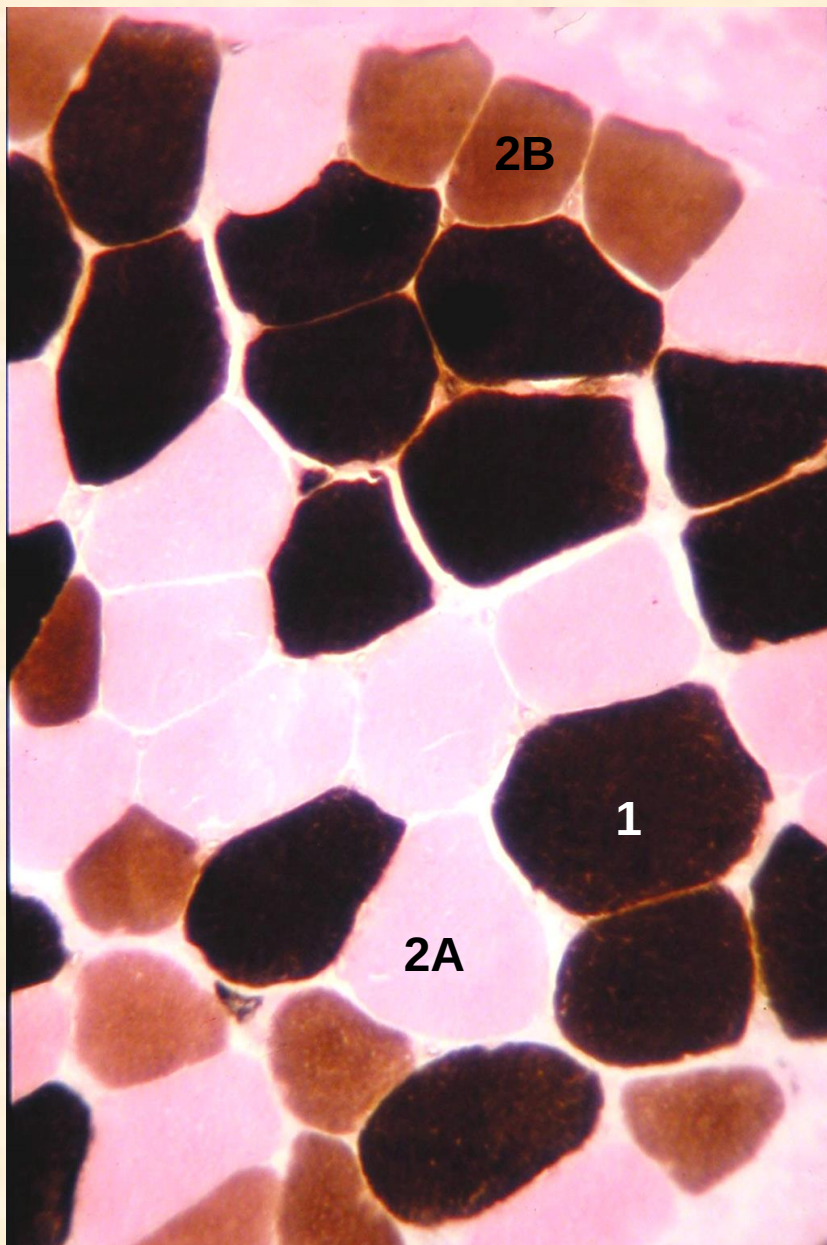
- ***NADH-TR*** (Nicotinamida adenina dinucleótido-TR)
- ***SDH*** (Succinato deshidrogenasa)

■ *Sospecha clínica de M. Mitocondrial*

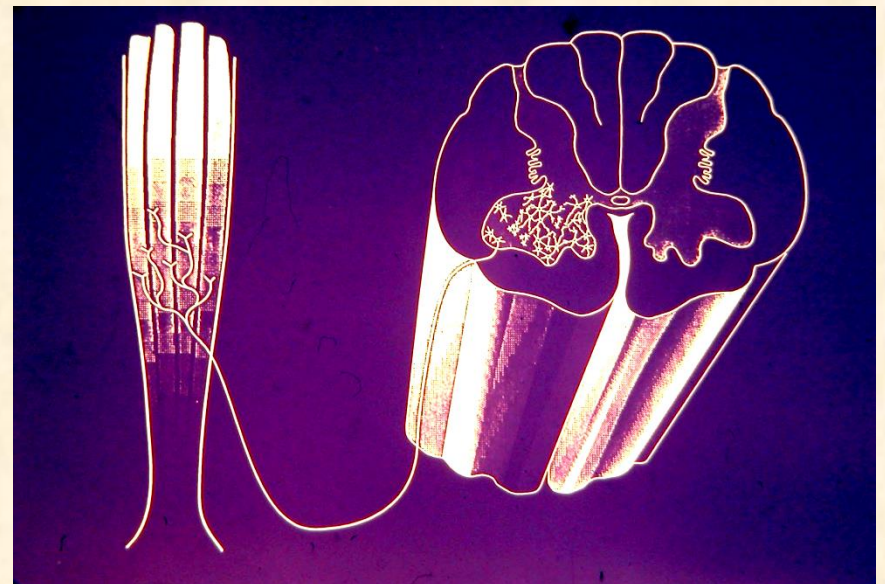
- ***COX*** (Citocromo-oxidasa) ***combinada con SDH (COX-SDH)***

■ *Sospecha clínica de glucogenosis*

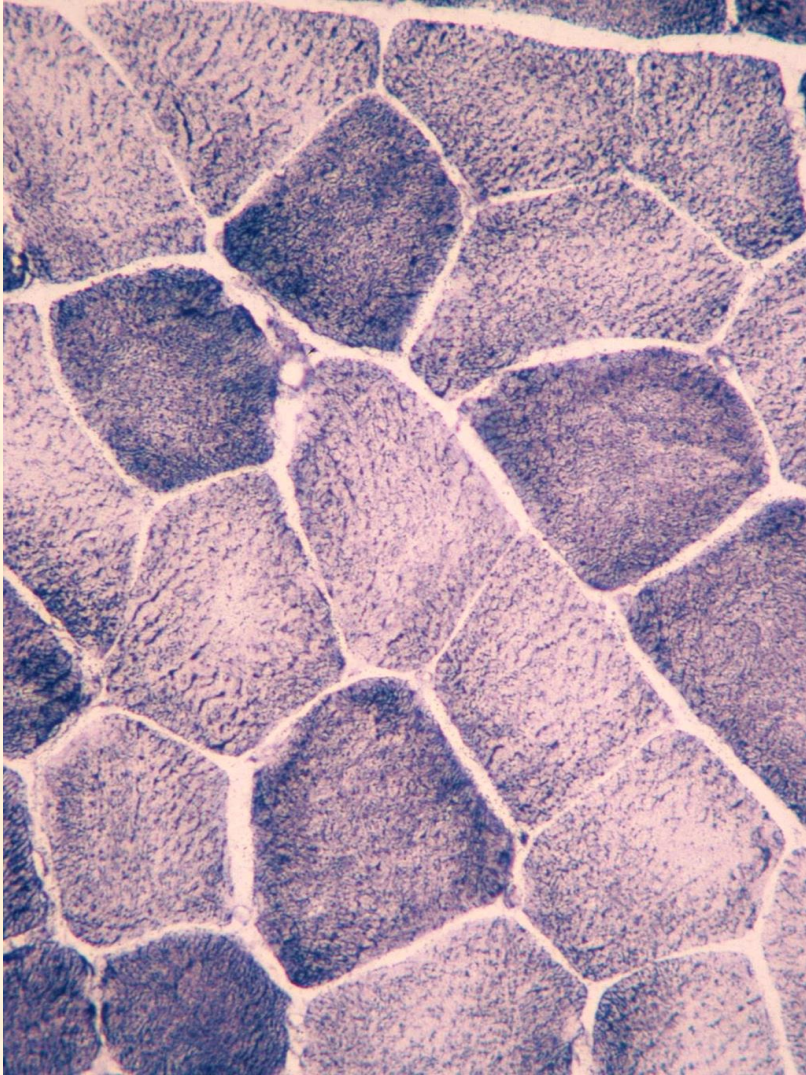
- ***Fosforilasa*** (Glucogenosis tipo V)
- ***Fosfofructoquinasa*** (Glucogenosis tipo VII)



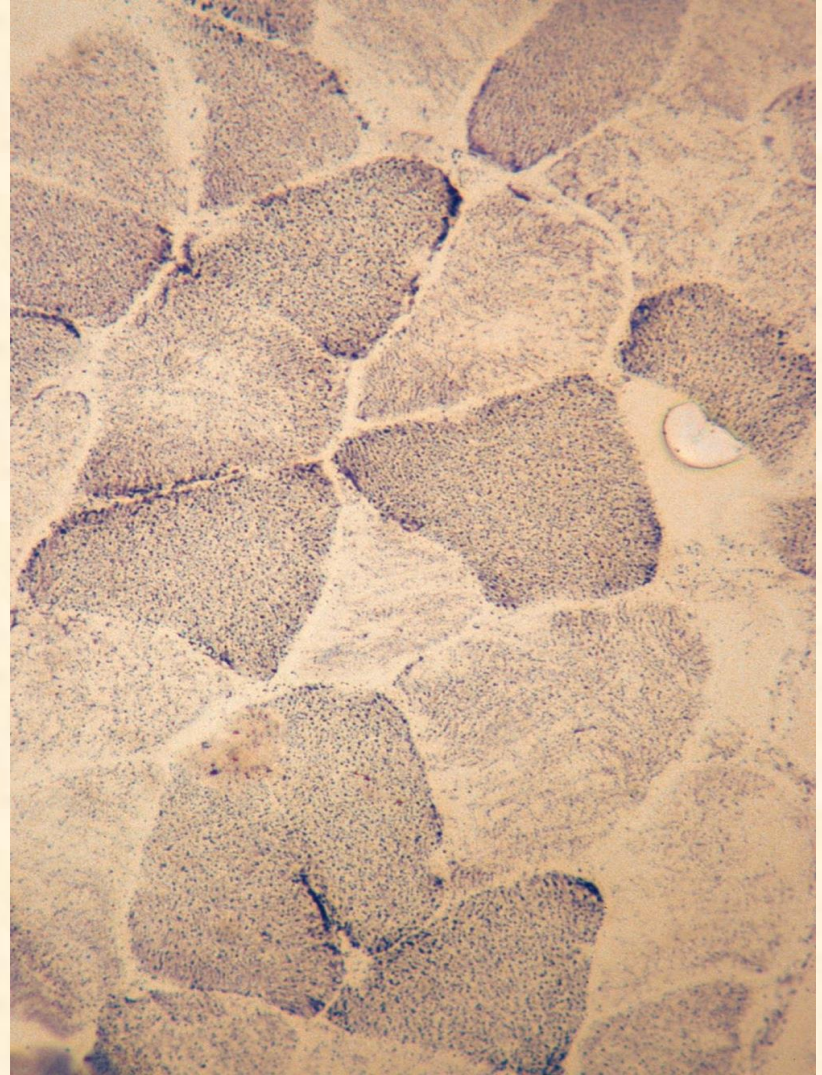
ATPasa pH 4,6



TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS OXIDATIVAS

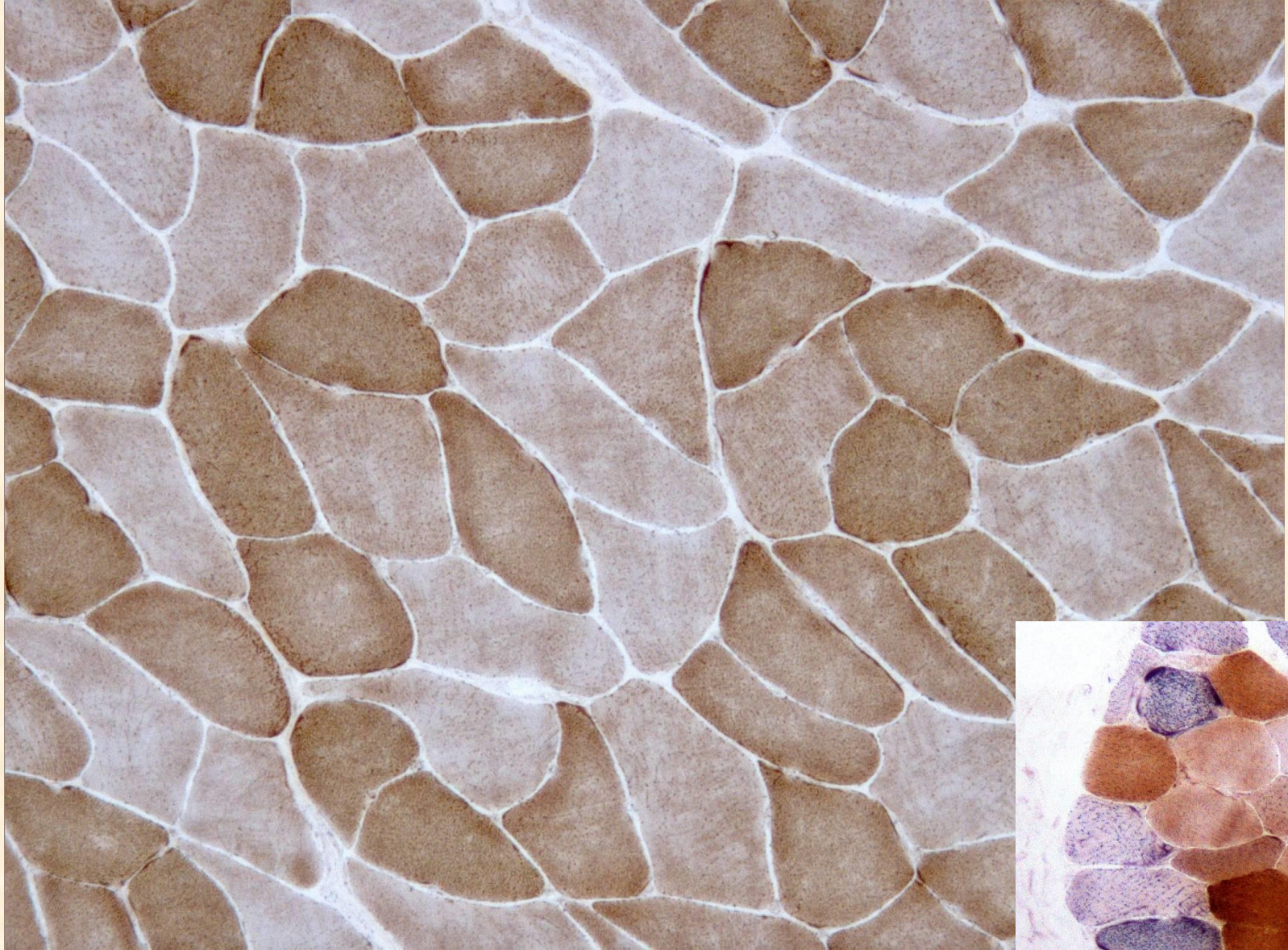


***Nicotinamida adenina dinucleótido-TR
(NADH-TR)***



Succinato deshidrogenasa (SDH)

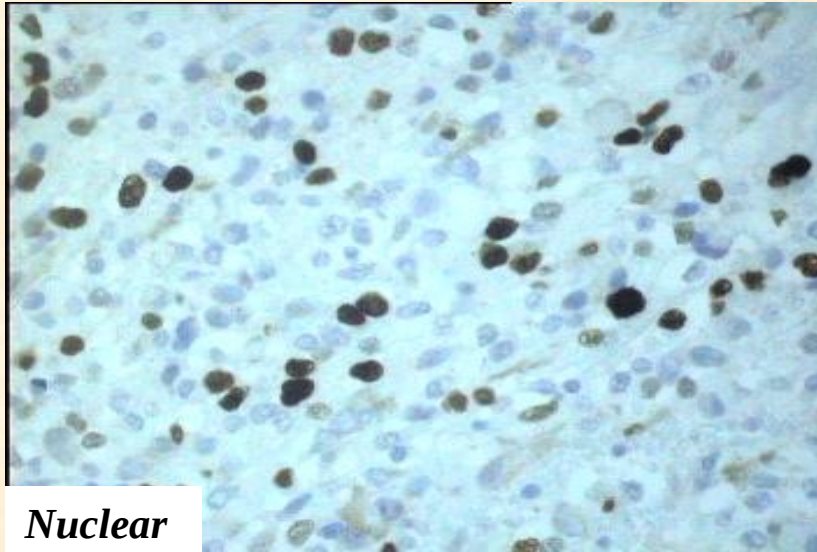
TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS



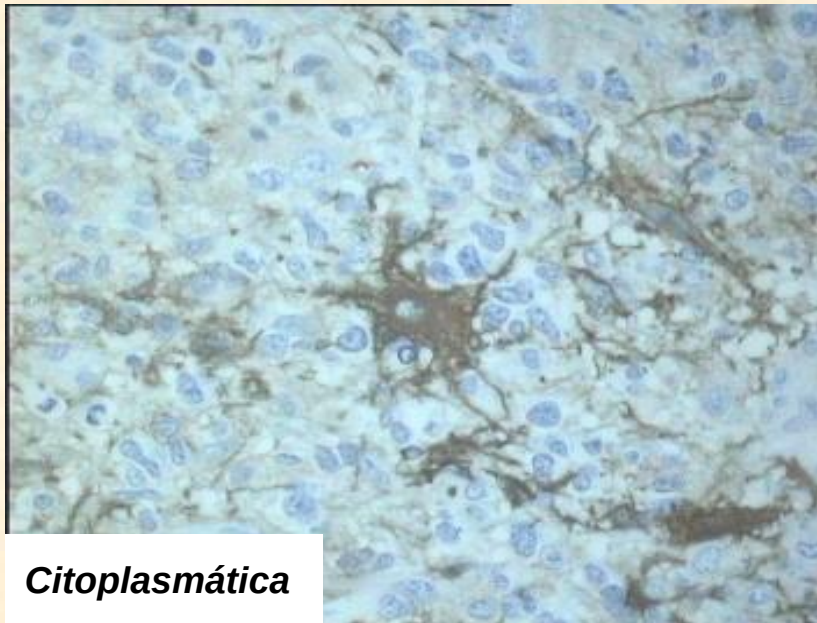
COX-SDH

TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

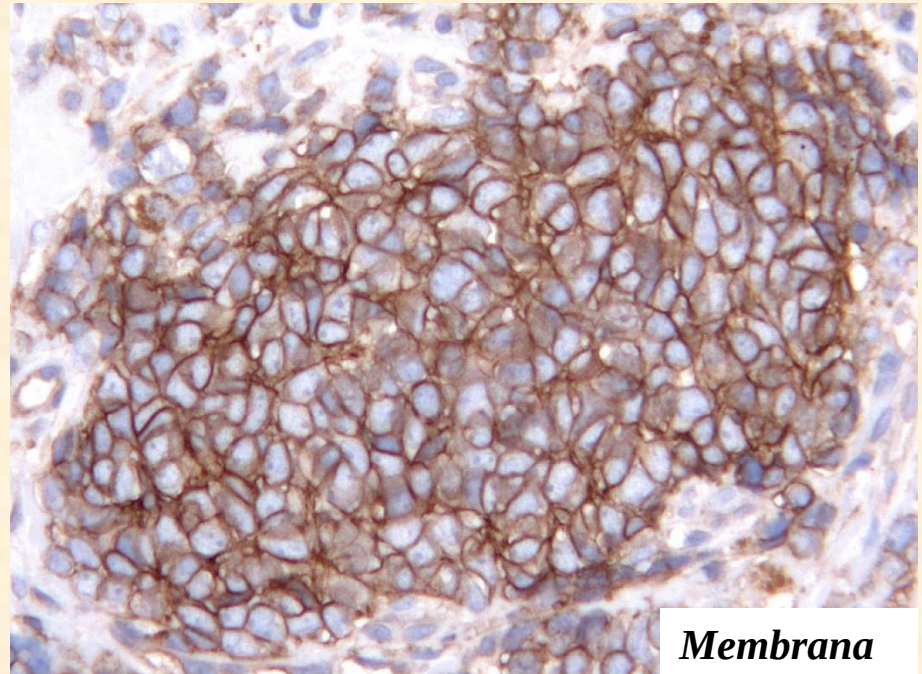
***Identificación de proteínas celulares
(antígenos)***



Nuclear



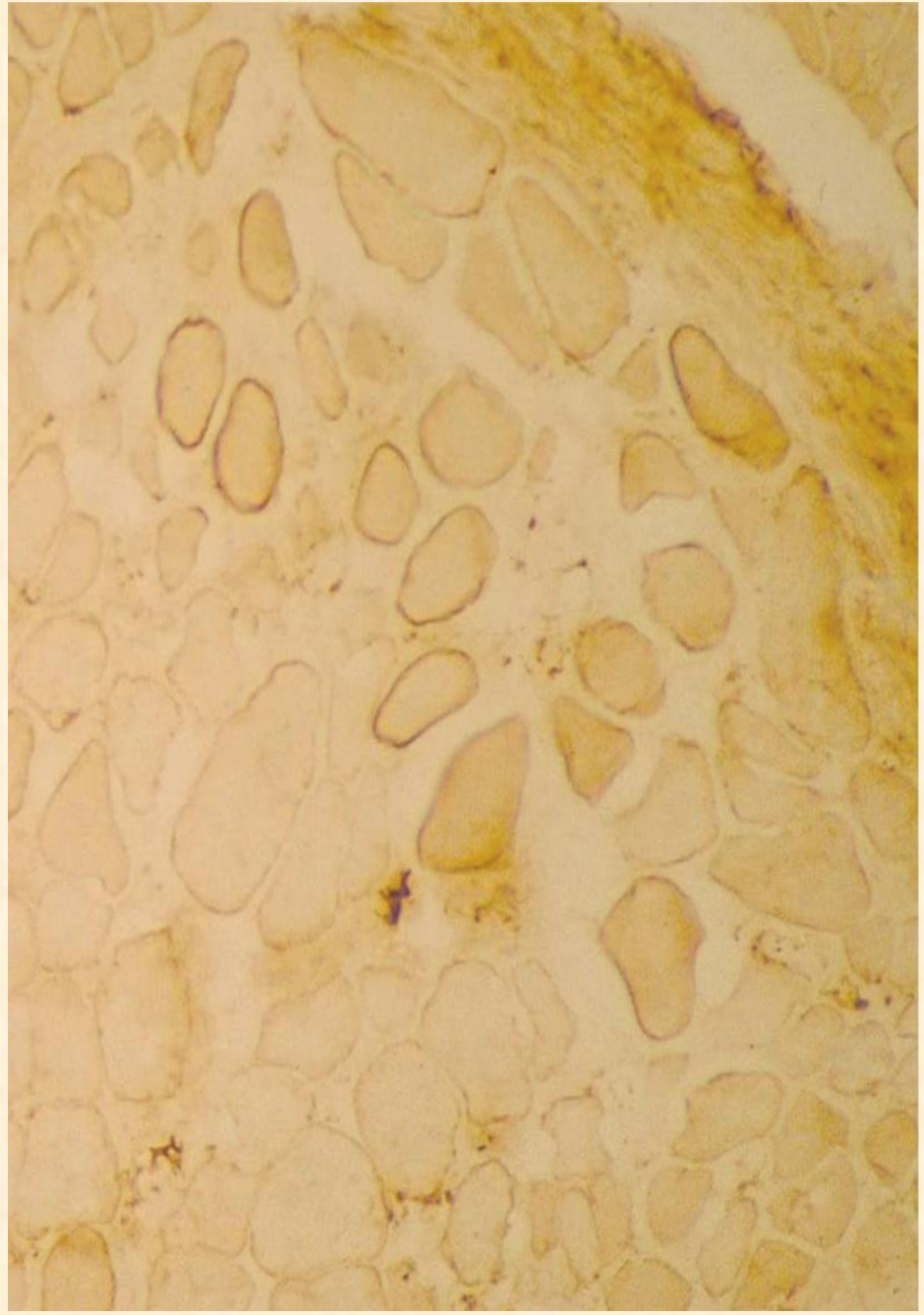
Citoplasmática



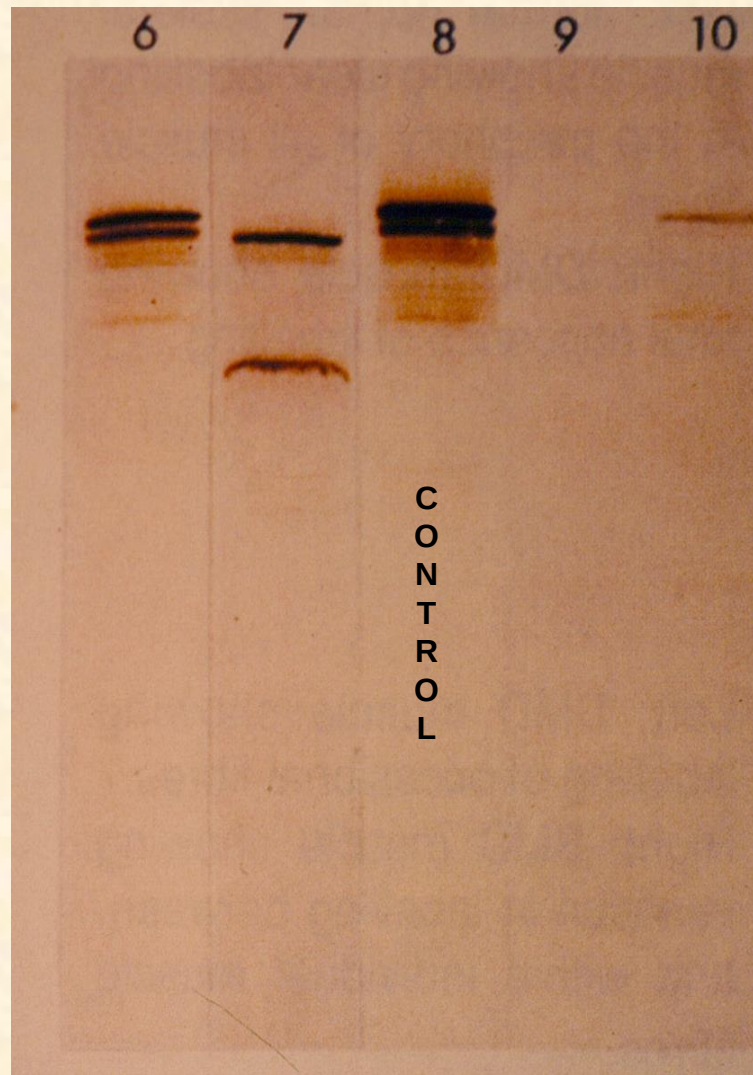
Membrana



Espectrina (control)



Western blot



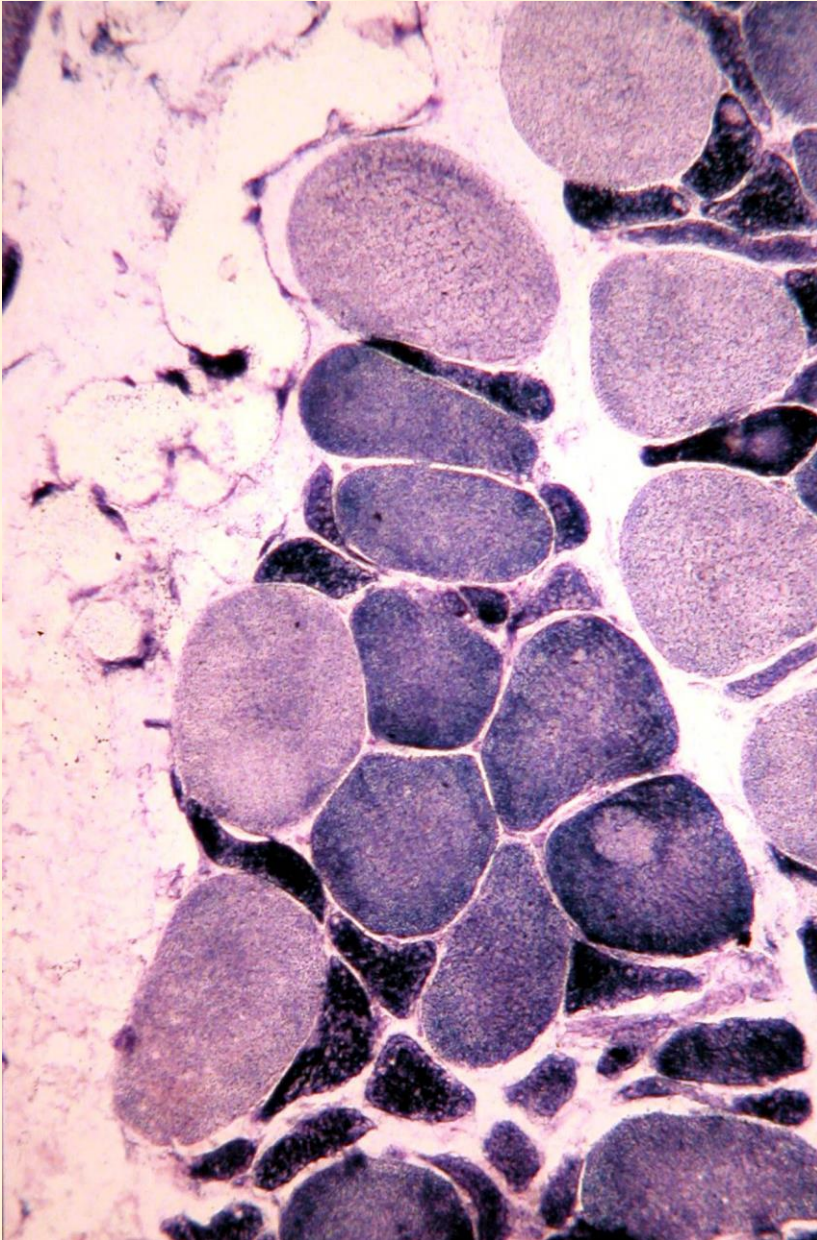
TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

Especialmente útiles en:

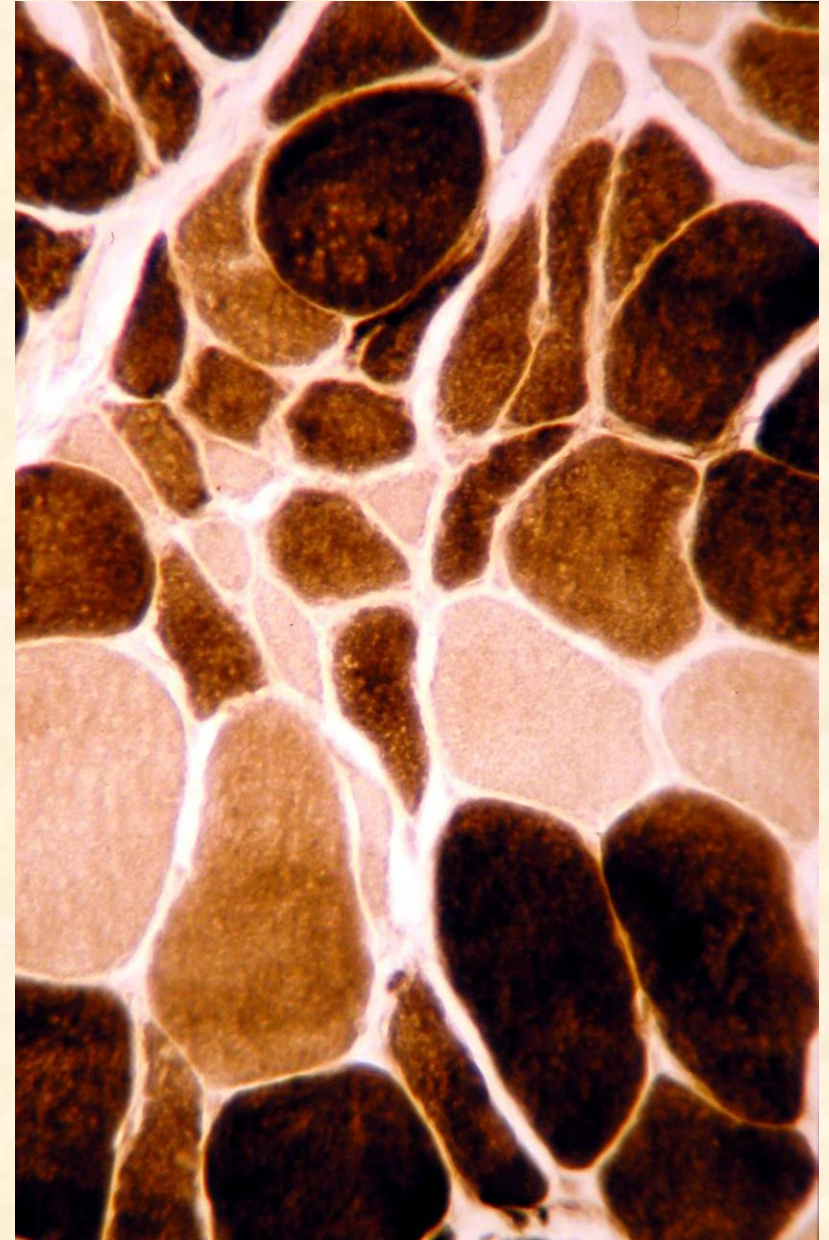
- *Atrofia por denervación*
- *Miopatías metabólicas(+ estudios bioquímicos y genéticos)*
- *Miopatías congénitas (+ ME y estudios genéticos)*

ATROFIA POR DENERVACIÓN

ATROFIA POR DENERVACIÓN

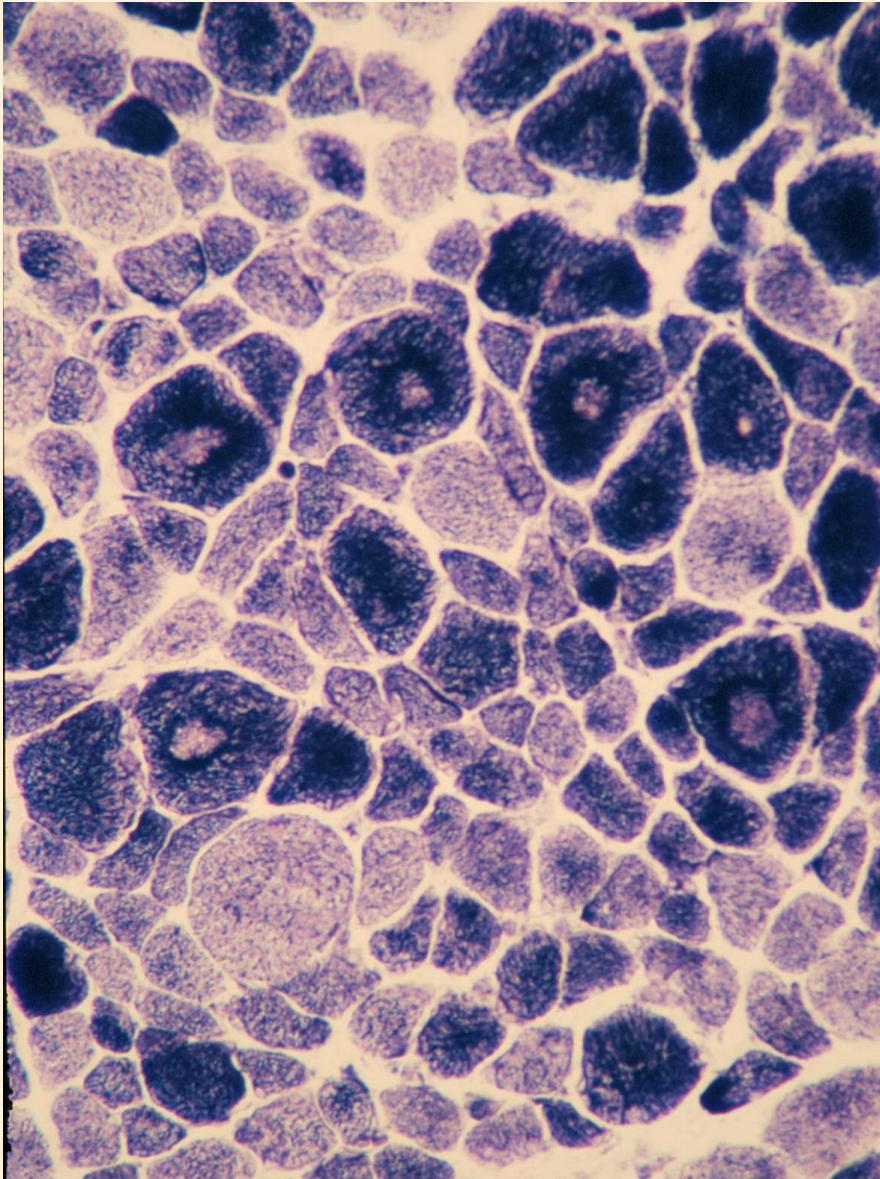


NADH-TR

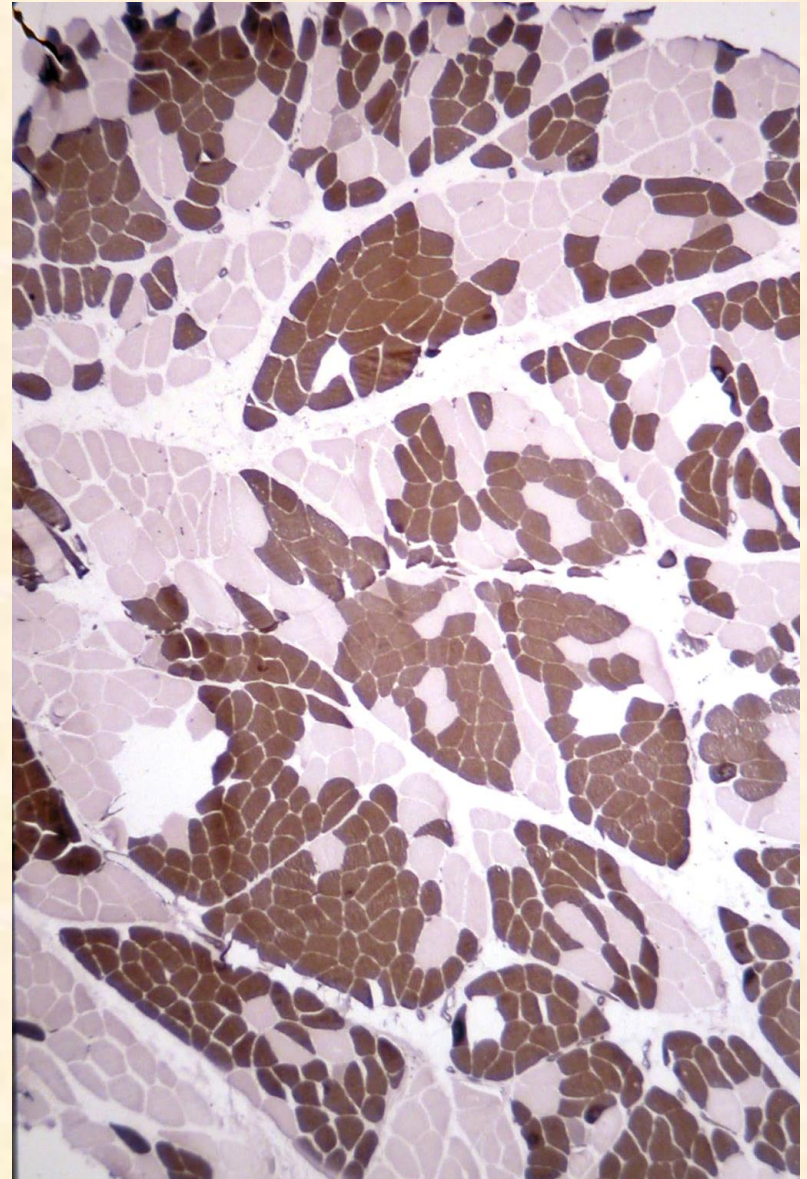


ATPasa pH 4,2

ATROFIA POR DENERVACIÓN



NADH-TR (Fibras “target”)



***Agrupamiento de tipos de fibras
ATPasa pH 4,2***

ATROFIA POR DENERVACIÓN

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

MIOPATÍAS METABÓLICAS

MIOPATÍAS METABÓLICAS

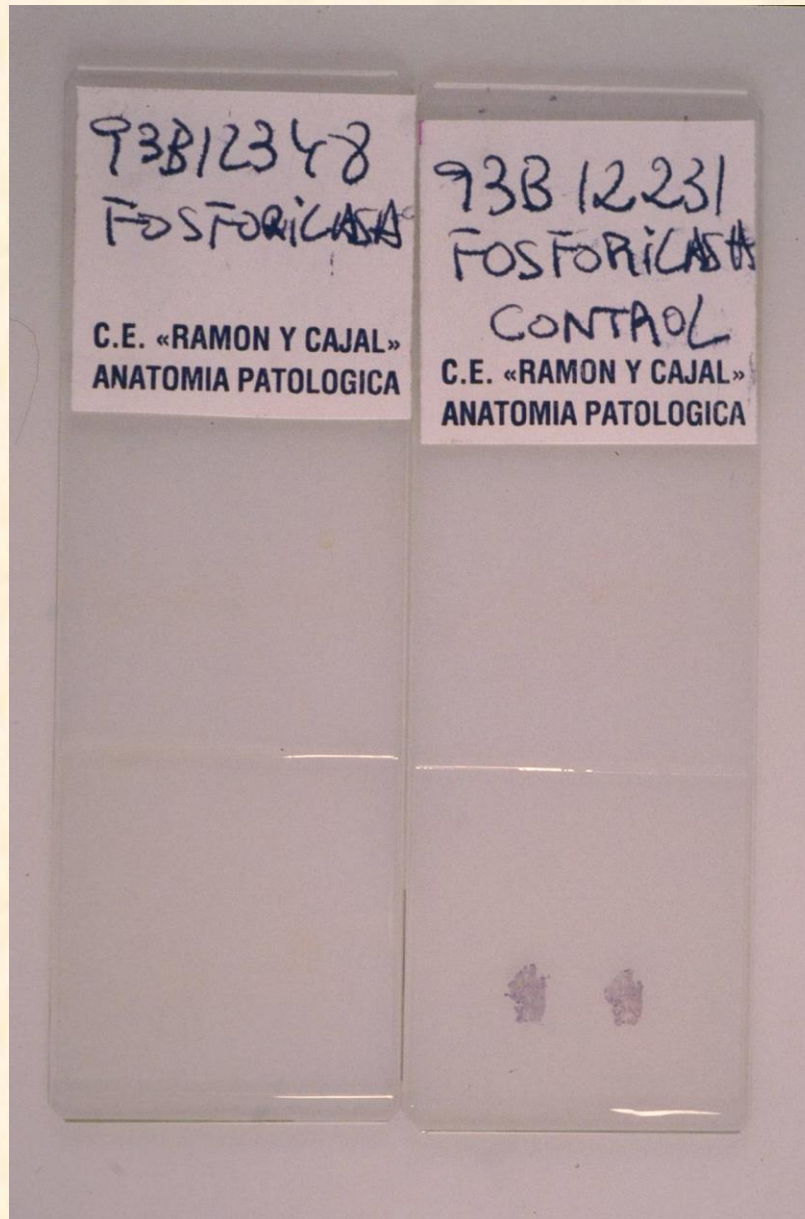
- ***Glucogenosis***
- ***Miopatías mitocondriales***
- ***Miopatías lipídicas***

GLUCOGENOSIS QUE AFECTAN AL MÚSCULO

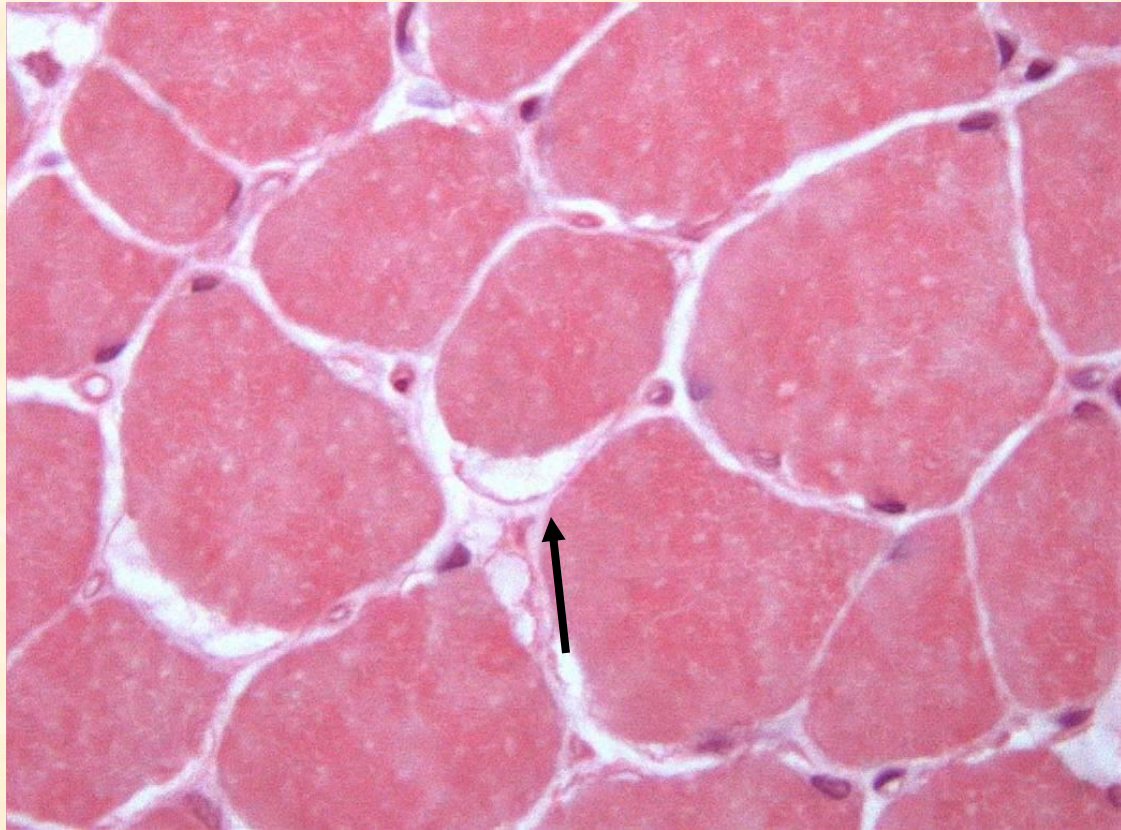
Tipos II, III, IV, V, VII y otros tipos menos frecuentes

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

Enfermedad de Mc. Ardle

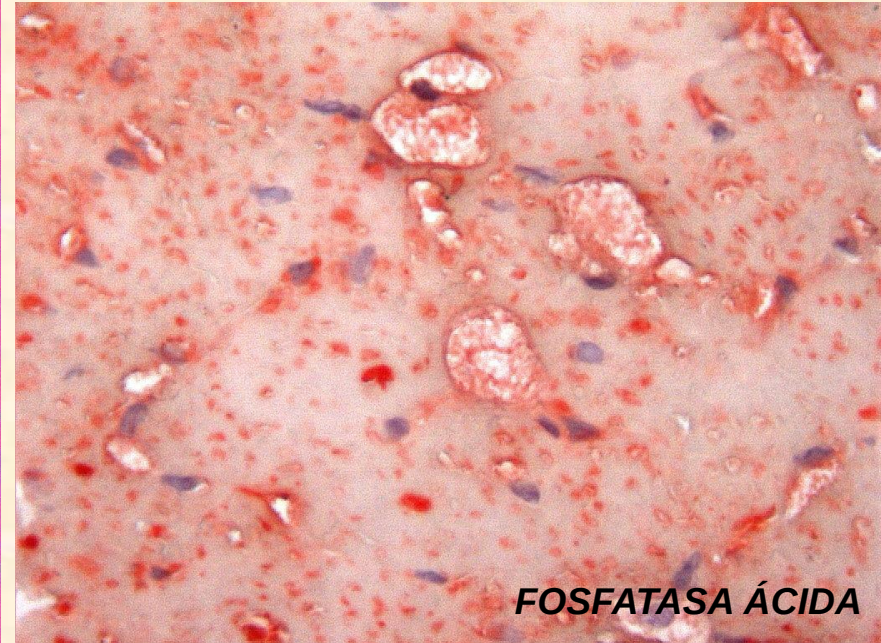
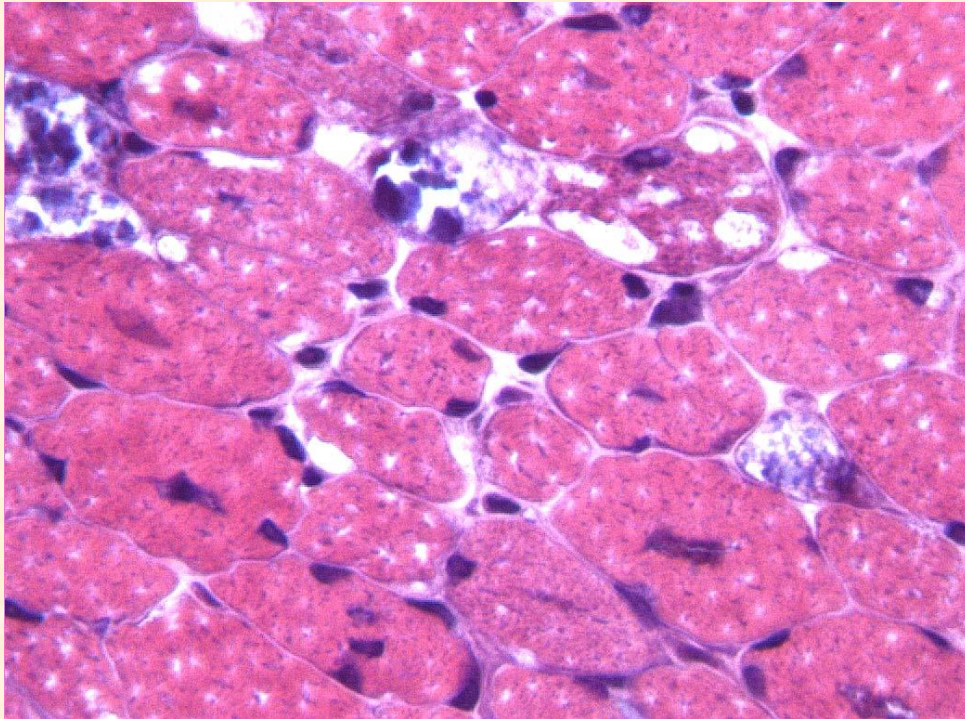


Fosforilasa

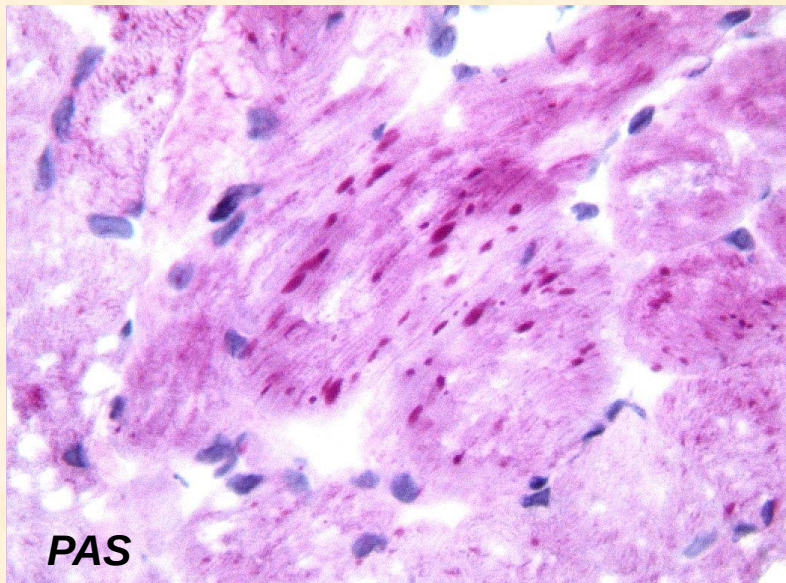


GLUCOGENOSIS TIPO V

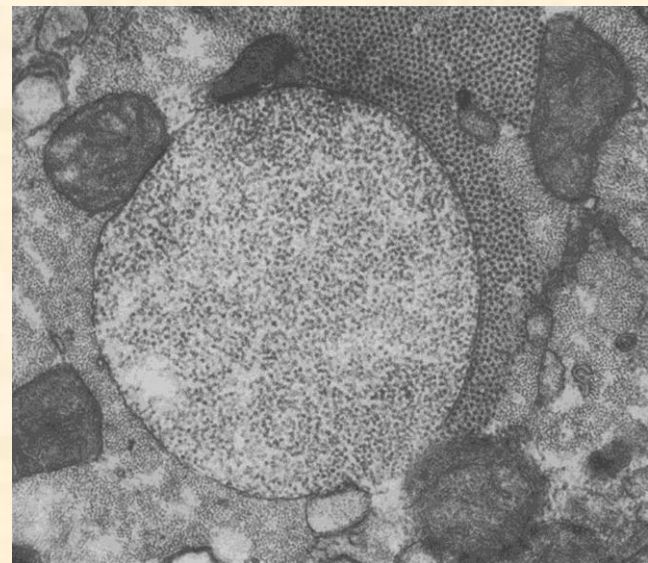
ENFERMEDAD DE POMPE (GLUCOGENOSIS TIPO II)



FOSFATASA ÁCIDA

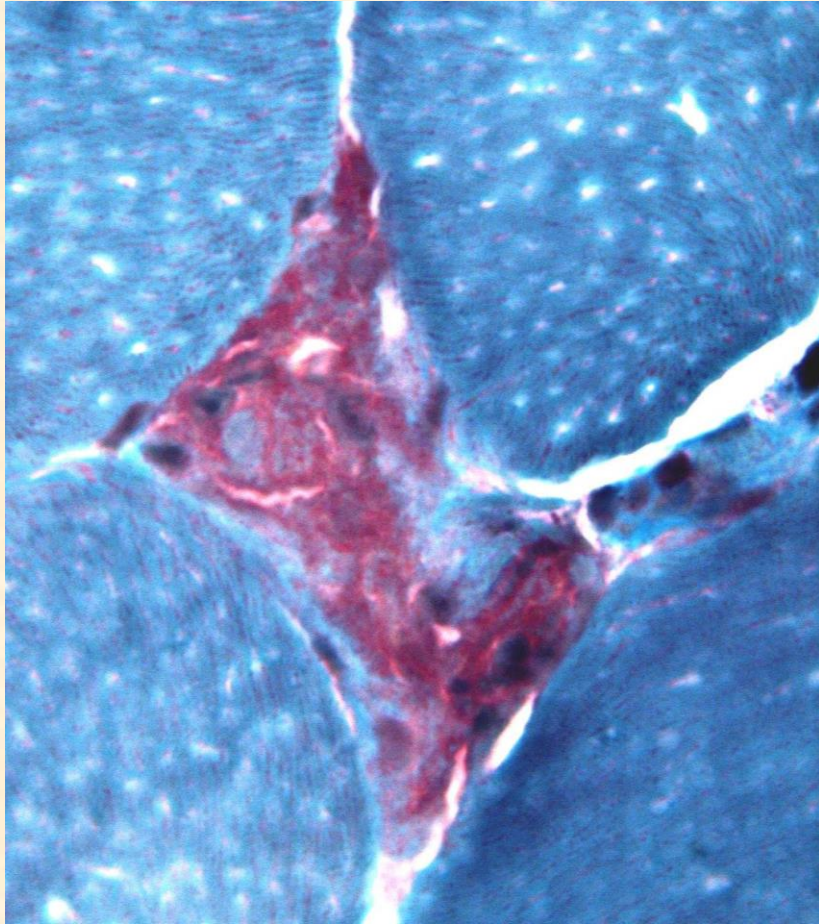


PAS

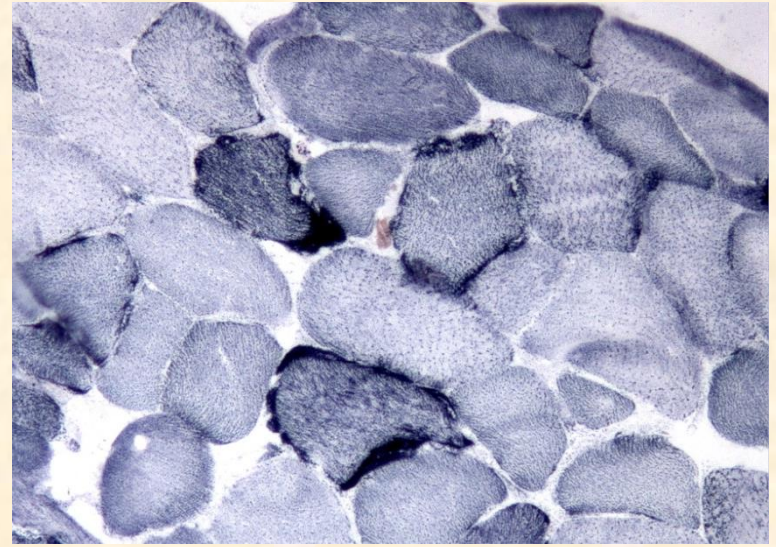


MIOPATÍAS MITOCONDRIALES

Fibras rojo-rasgadas



Tricrómico modificado de Gomori

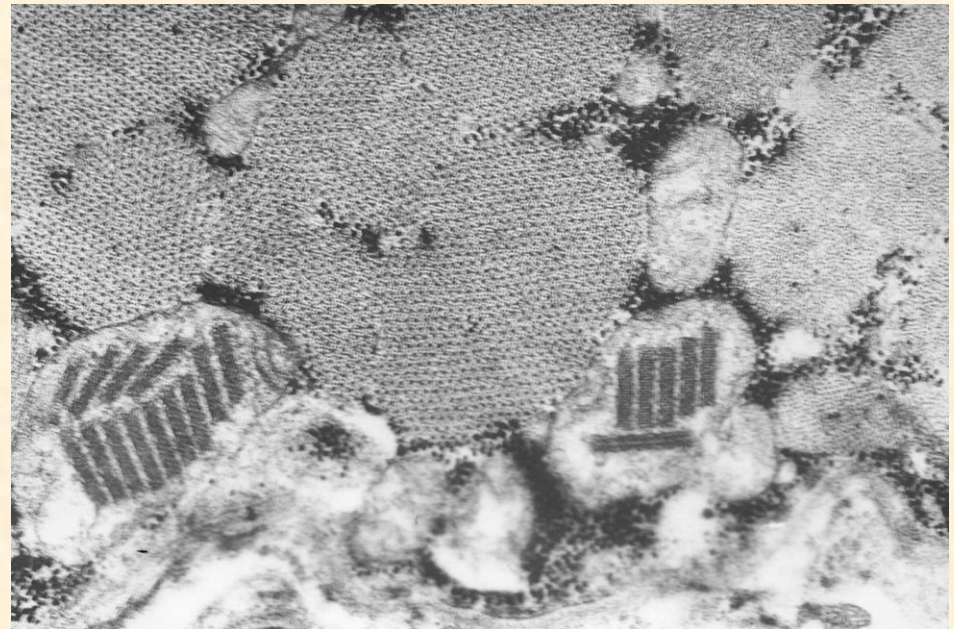
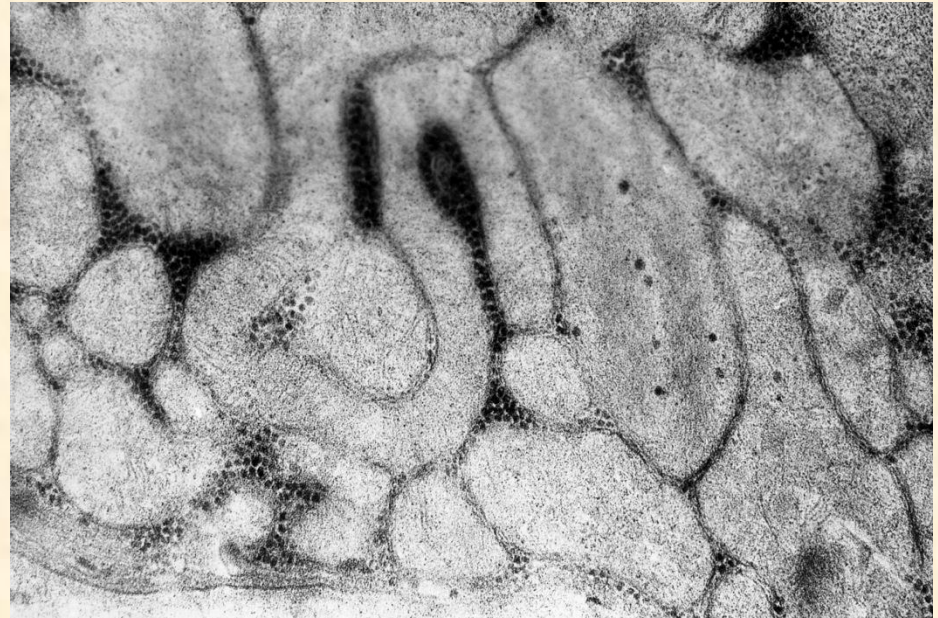
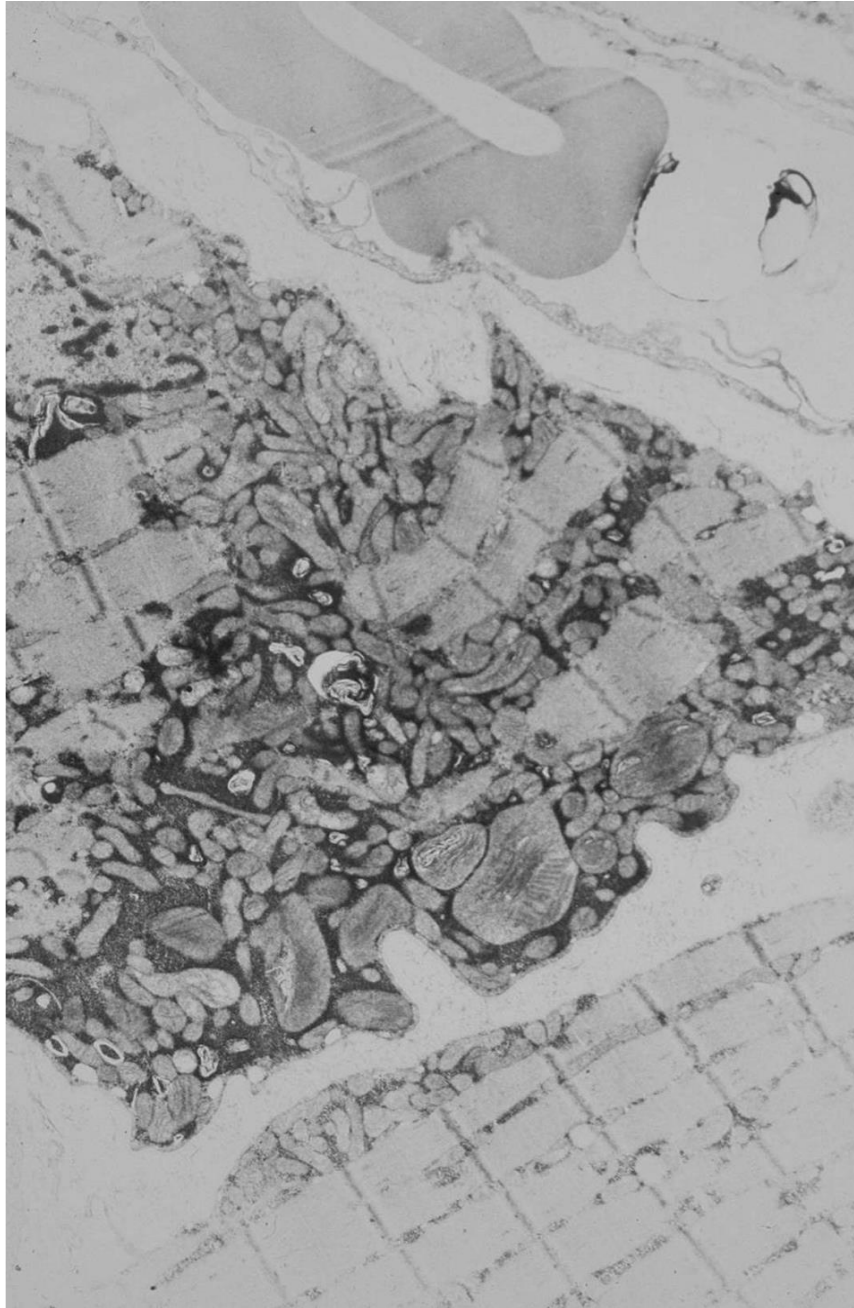


NADH-TR



SDH

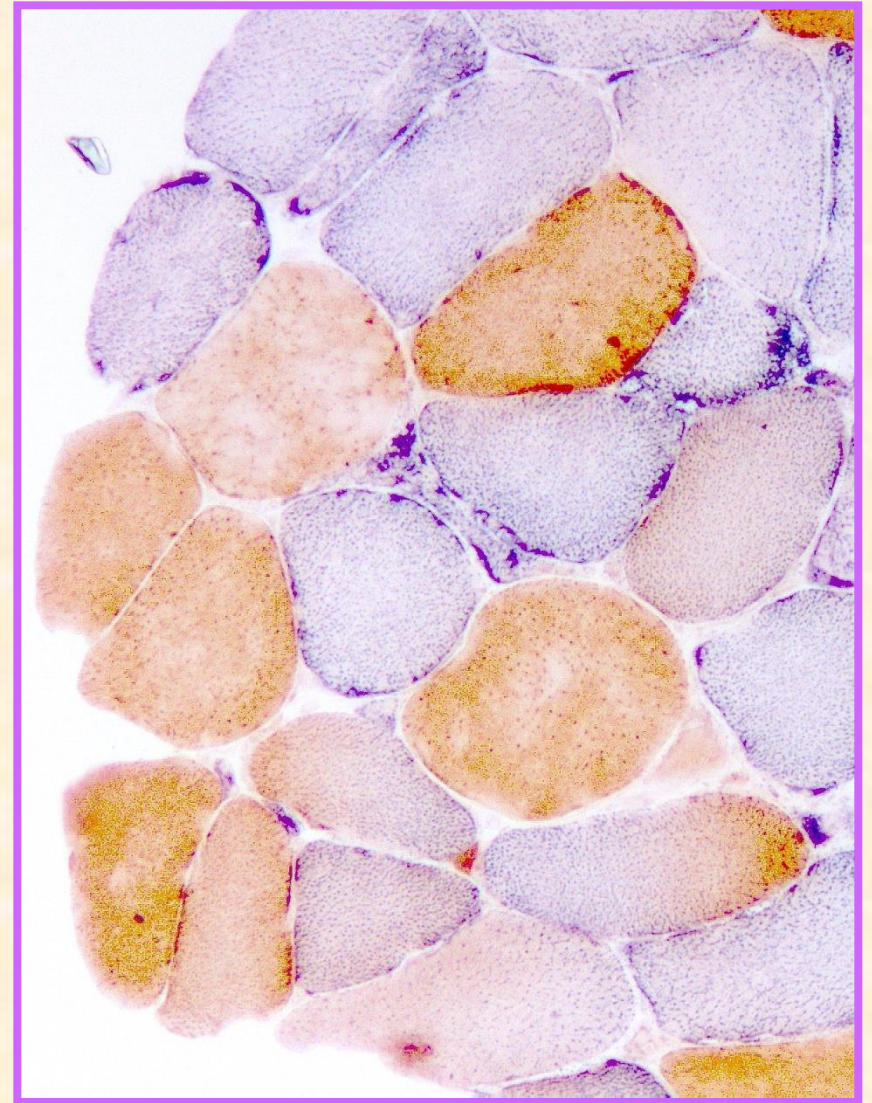
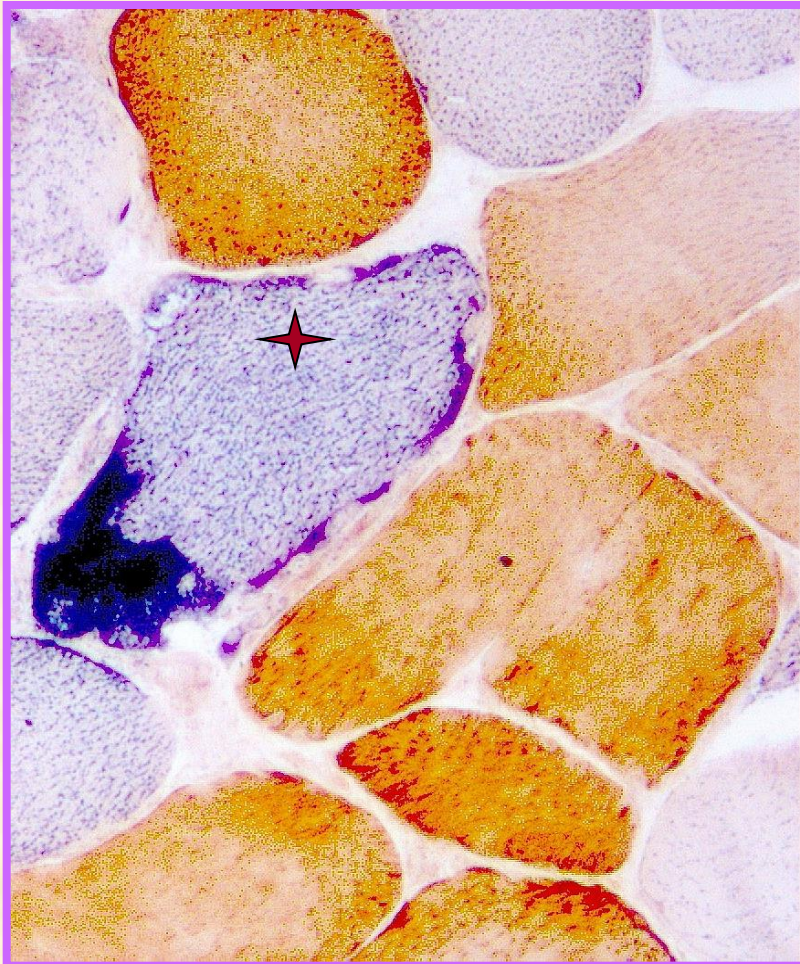
Miopatía mitocondrial



MIOPATÍAS MITOCONDRIALES

Fibras rojo-rasgadas

- *Características de las miopatías mitocondriales, aunque no son patognomónicas.*
- *Pueden verse en diversas situaciones (miositis por cuerpos de inclusión, dermatomiositis...) e, incluso, en personas de edad.*
- *No se observan en niños menores de 3 años.*

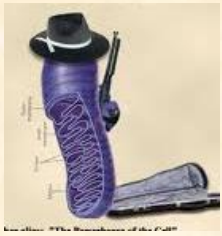


COX-SDH (MERRF)

MIOPATÍAS MITOCONDRIALES

Valoración de la actividad COX

- **Fibras rojo-rasgadas COX negativas:** MERRF, KSS, CPEO.
(Deleciones del ADN mitocondrial o mutaciones del ARNt que ocasionan defectos en la síntesis protéica)
- **Fibras rojo-rasgadas COX positivas:** MELAS o en mutaciones de genes estructurales mitocondriales
- **Se pueden ver fibras COX negativas sin características de fibras rojo-rasgadas** (Sugieren que el defecto enzimático precede a la proliferación mitocondrial).
- **Pueden encontrarse fibras COX negativas en miopatías inflamatorias y en personas de edad.**
- **En la deficiencia de COX infantil hay disminución difusa de actividad COX**



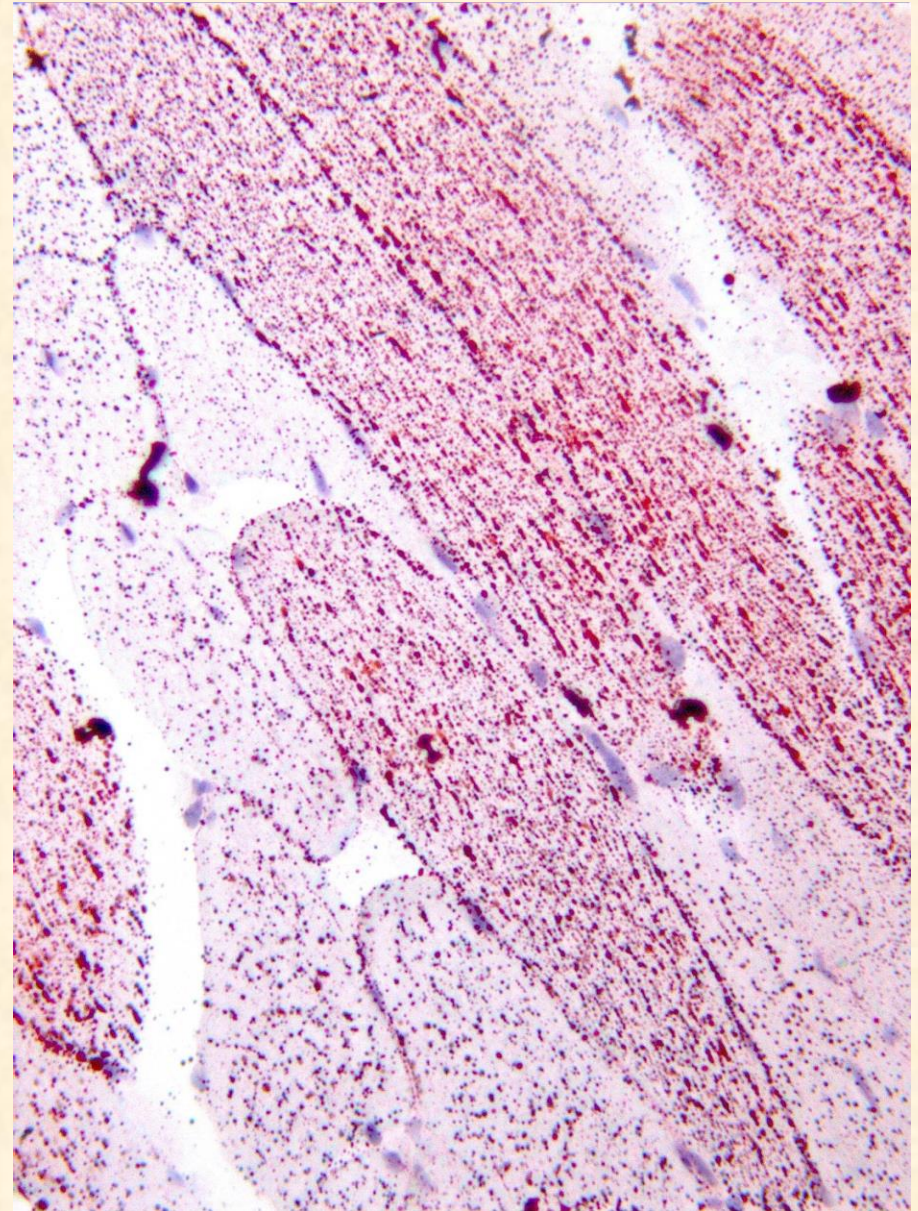
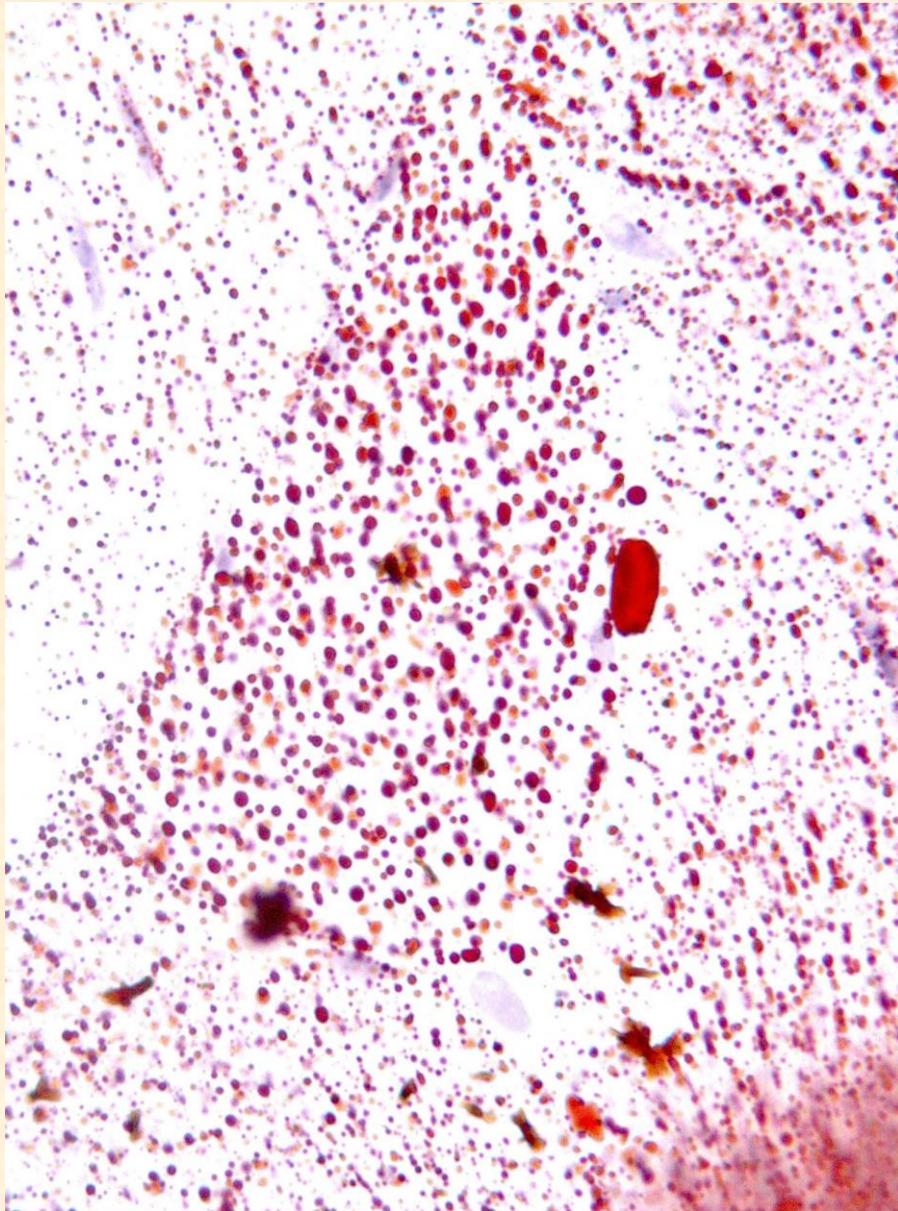
???

MIOPATÍAS MITOCONDRIALES

Si hay sospecha clínica de Miopatía Mitocondrial:

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

MIOPATÍA LIPÍDICA



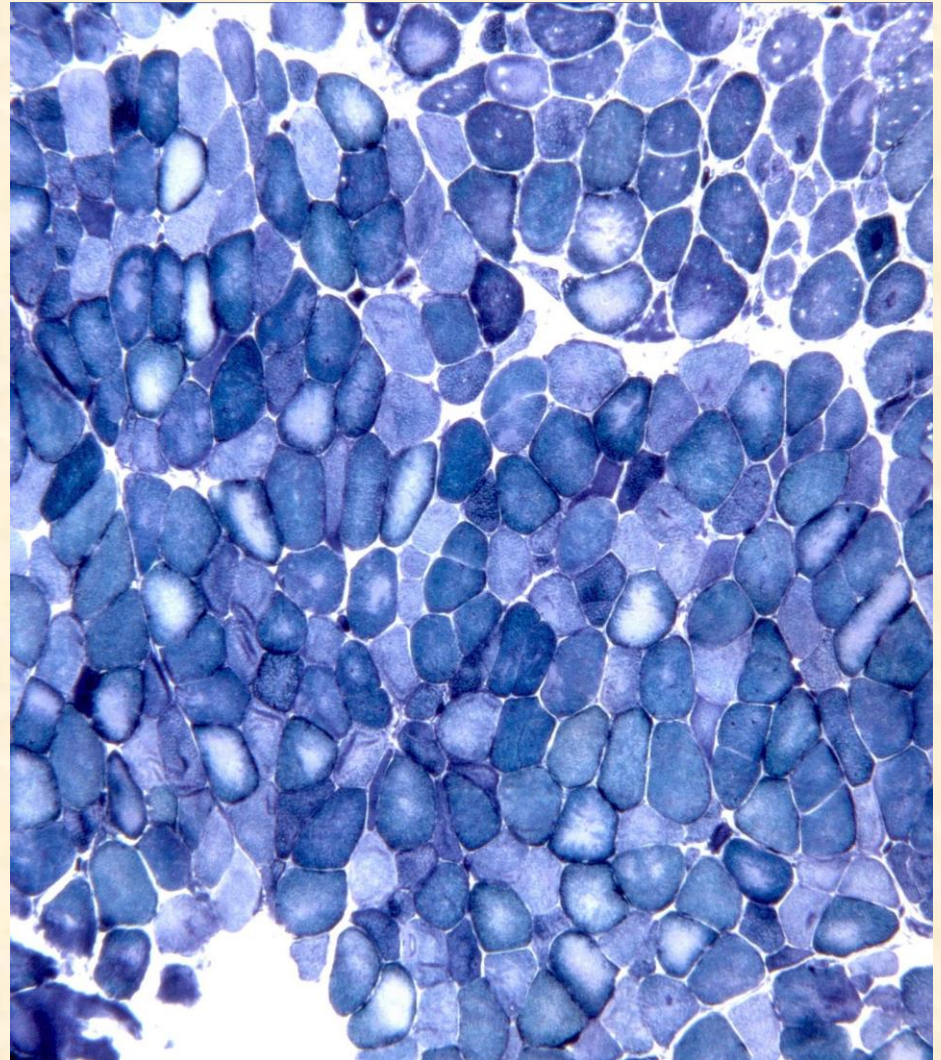
Déficit primario de carnitina (Oil-Red-O)

Déficit de Carnitina Parmitoil Transferasa

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

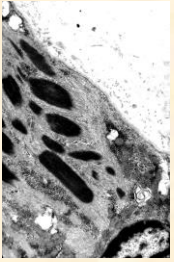
MIOPATÍA HIPOTIROIDEA

- *Hallazgos inespecíficos en la biopsia muscular*
- *Son bastante constantes las alteraciones con técnicas oxidativas*

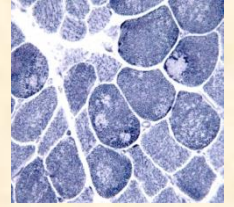


DPNH-TR

MIOPATÍAS CONGÉNITAS

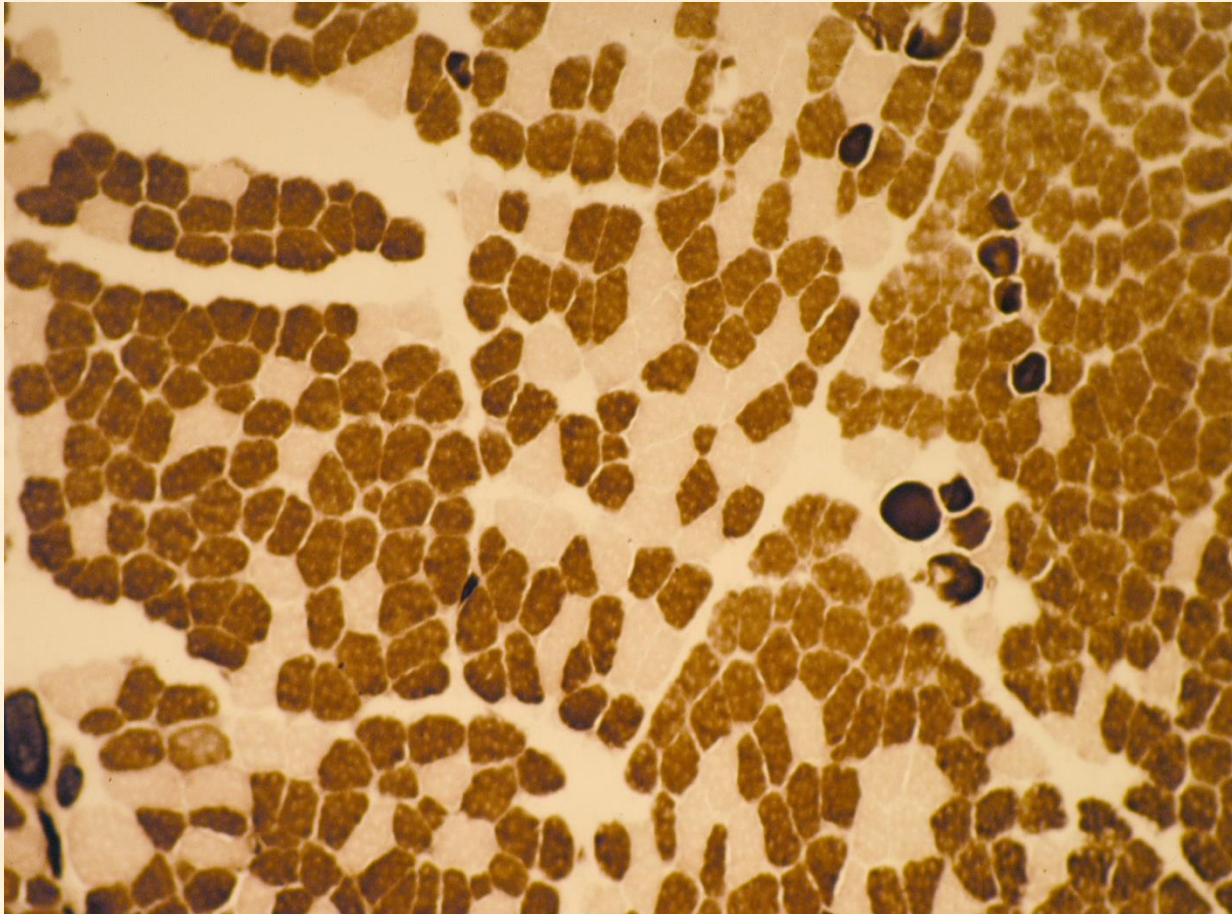


MIOPATÍAS CONGÉNITAS



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

MIOPATÍAS CONGÉNITAS



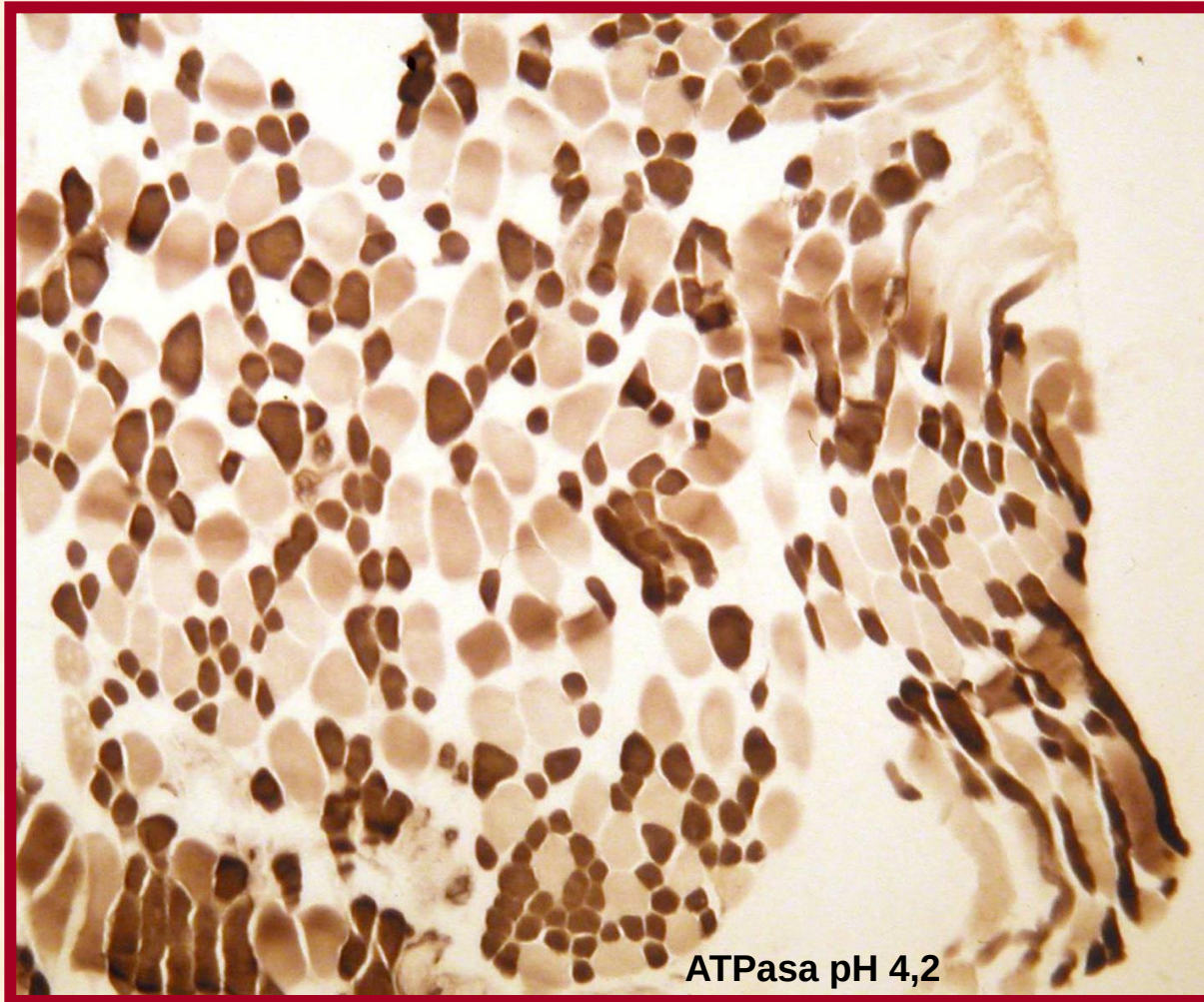
**Predominio de fibras tipo 1
(ATPasa pH 4,2)**



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

Desproporción congénita de tipos de fibras

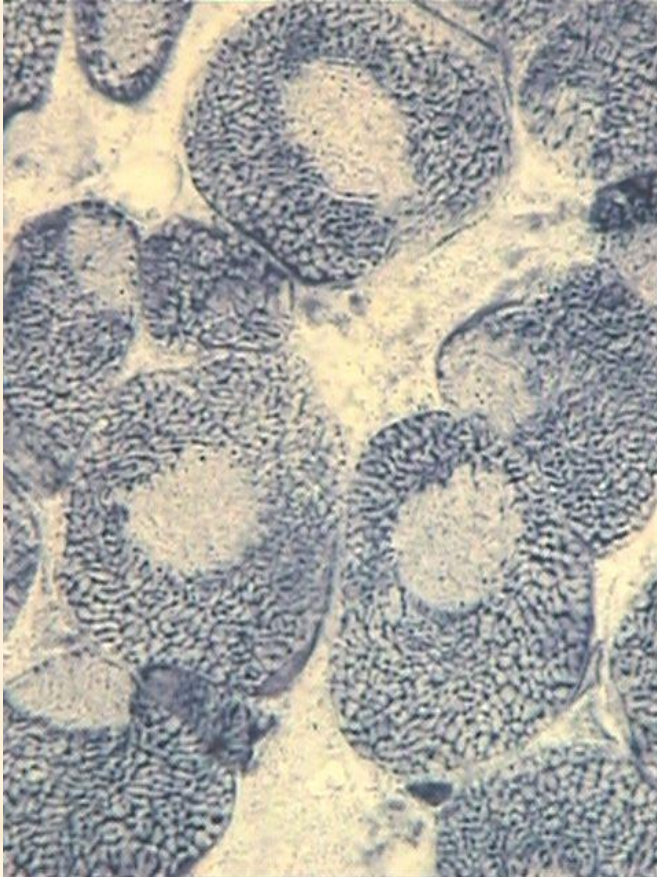
(Correlación clínico-patológica)



Atrofia selectiva de fibras tipo 1

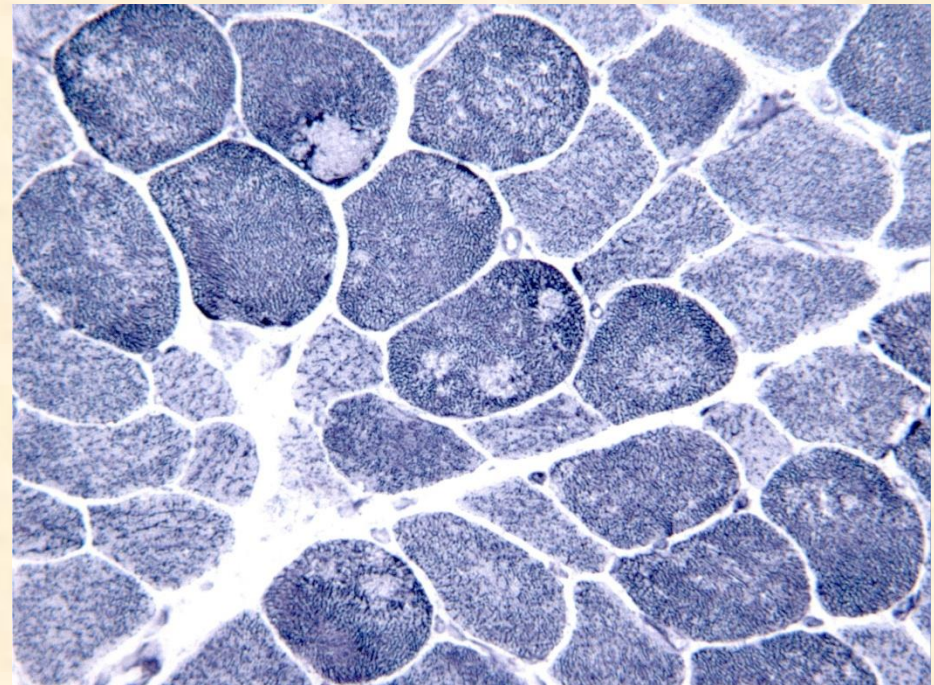
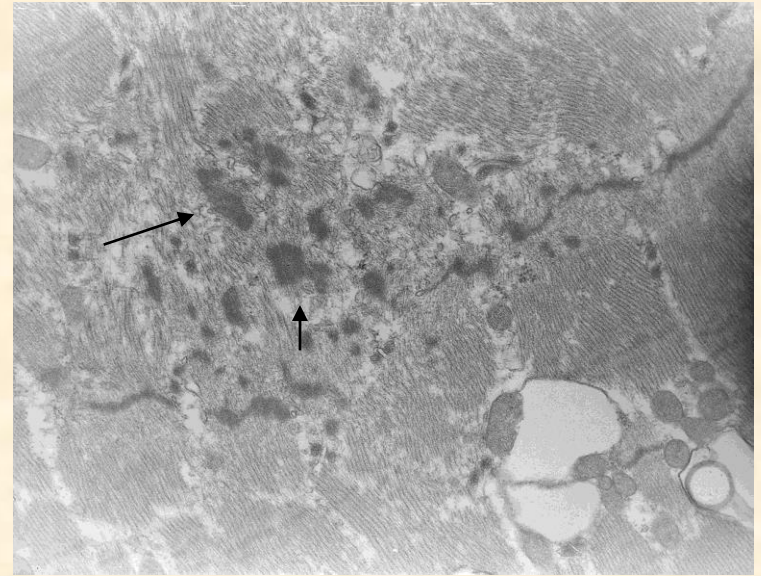
Los diámetros medios de ambos tipos de fibras deben variar al menos en un 45%

Miopatías con cores

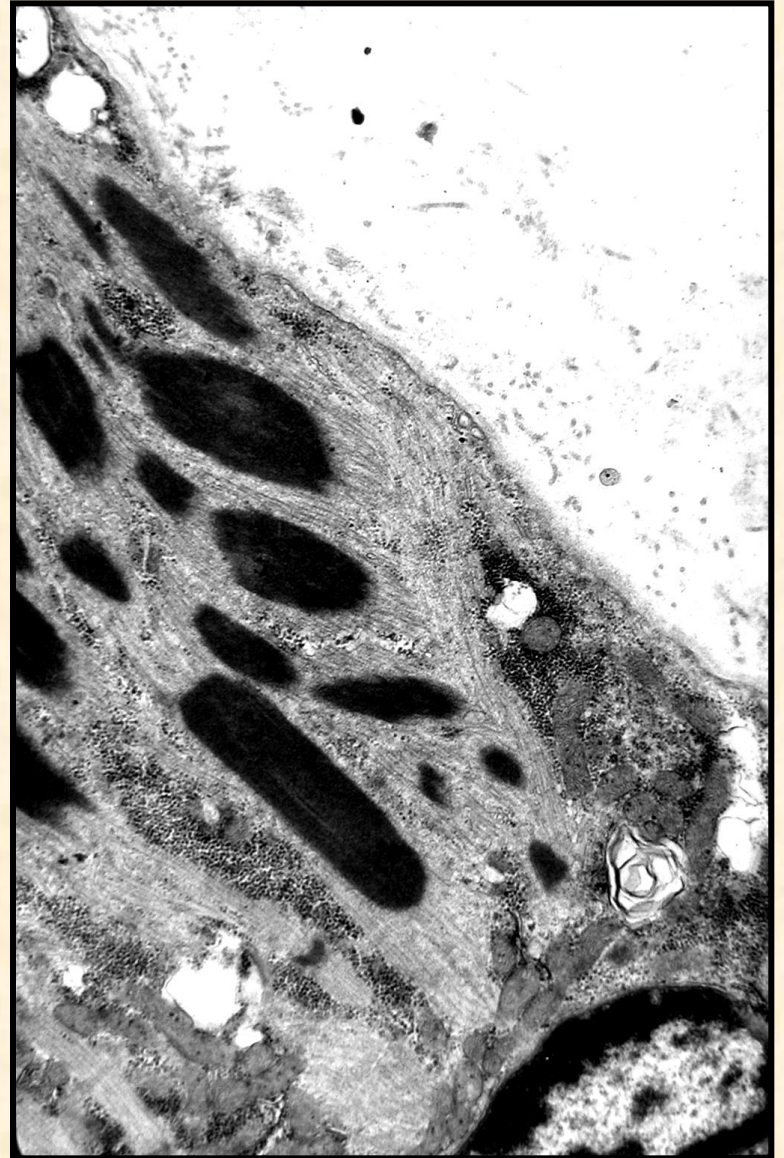
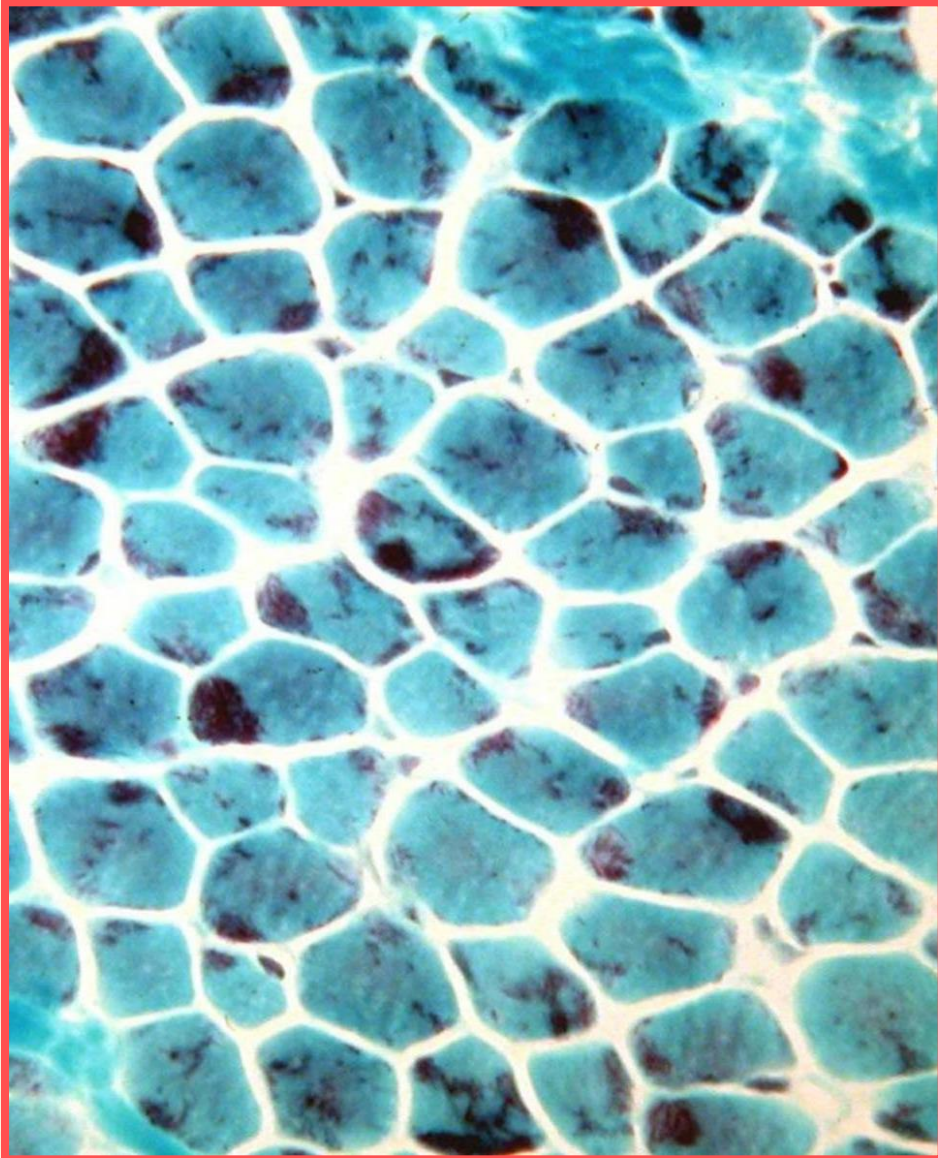


Cores centrales

(NADH-TR)



Multiminicores

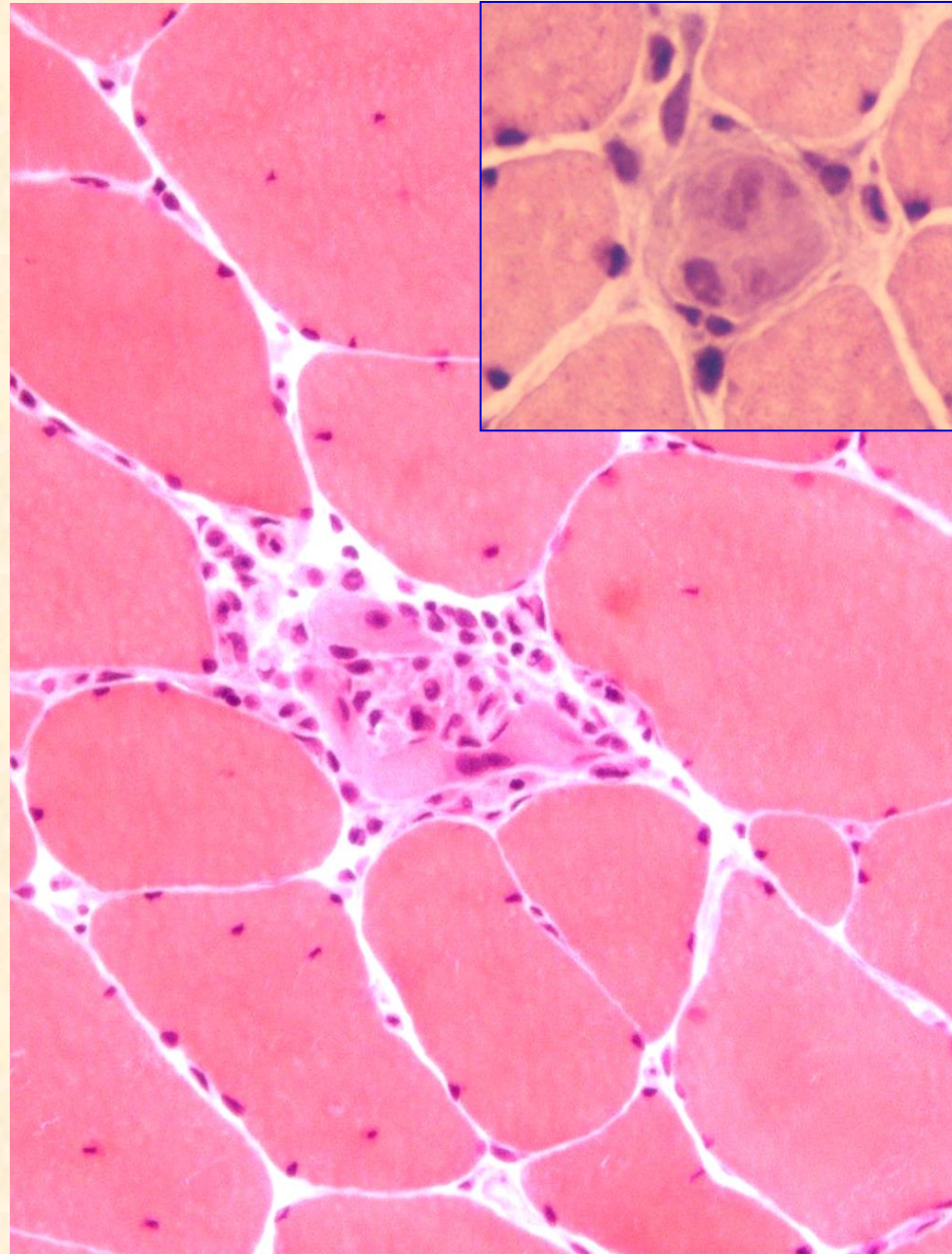
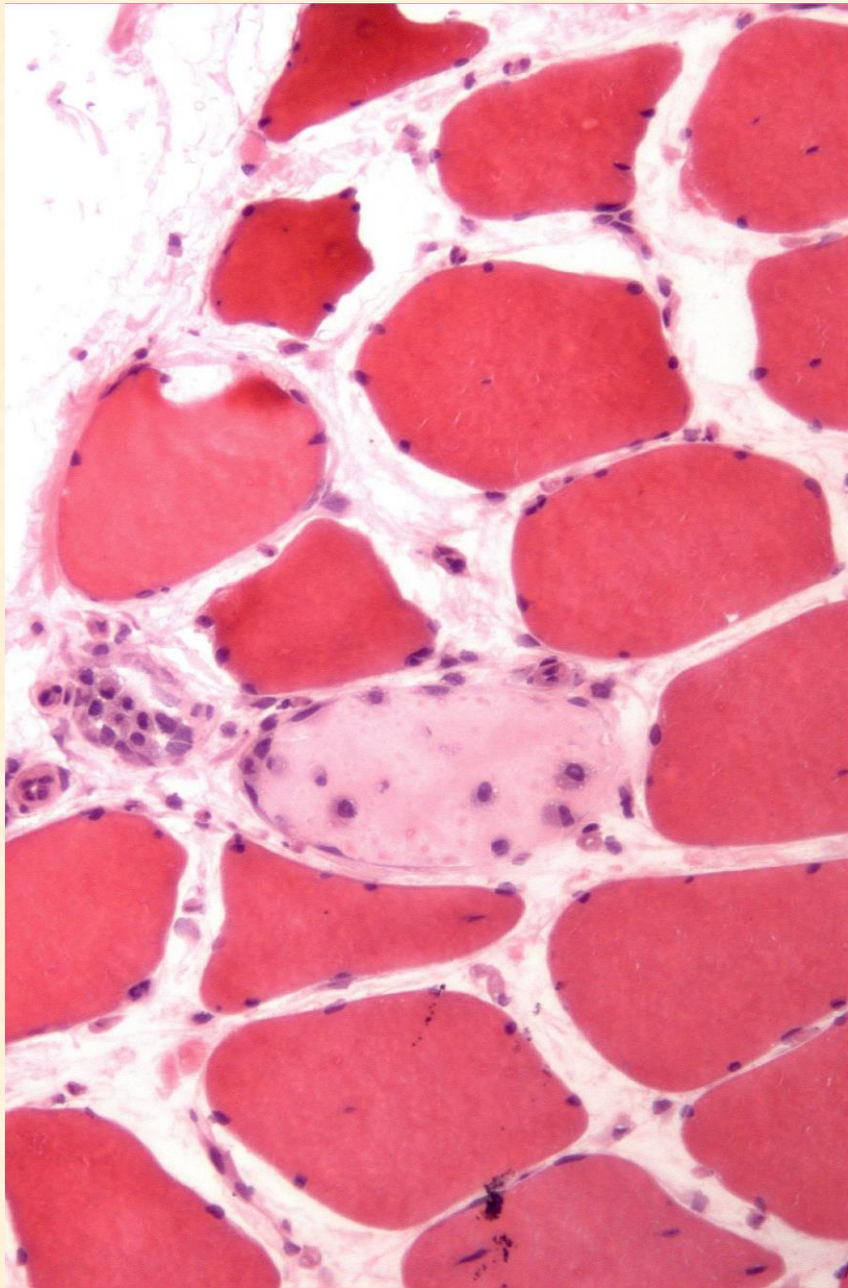


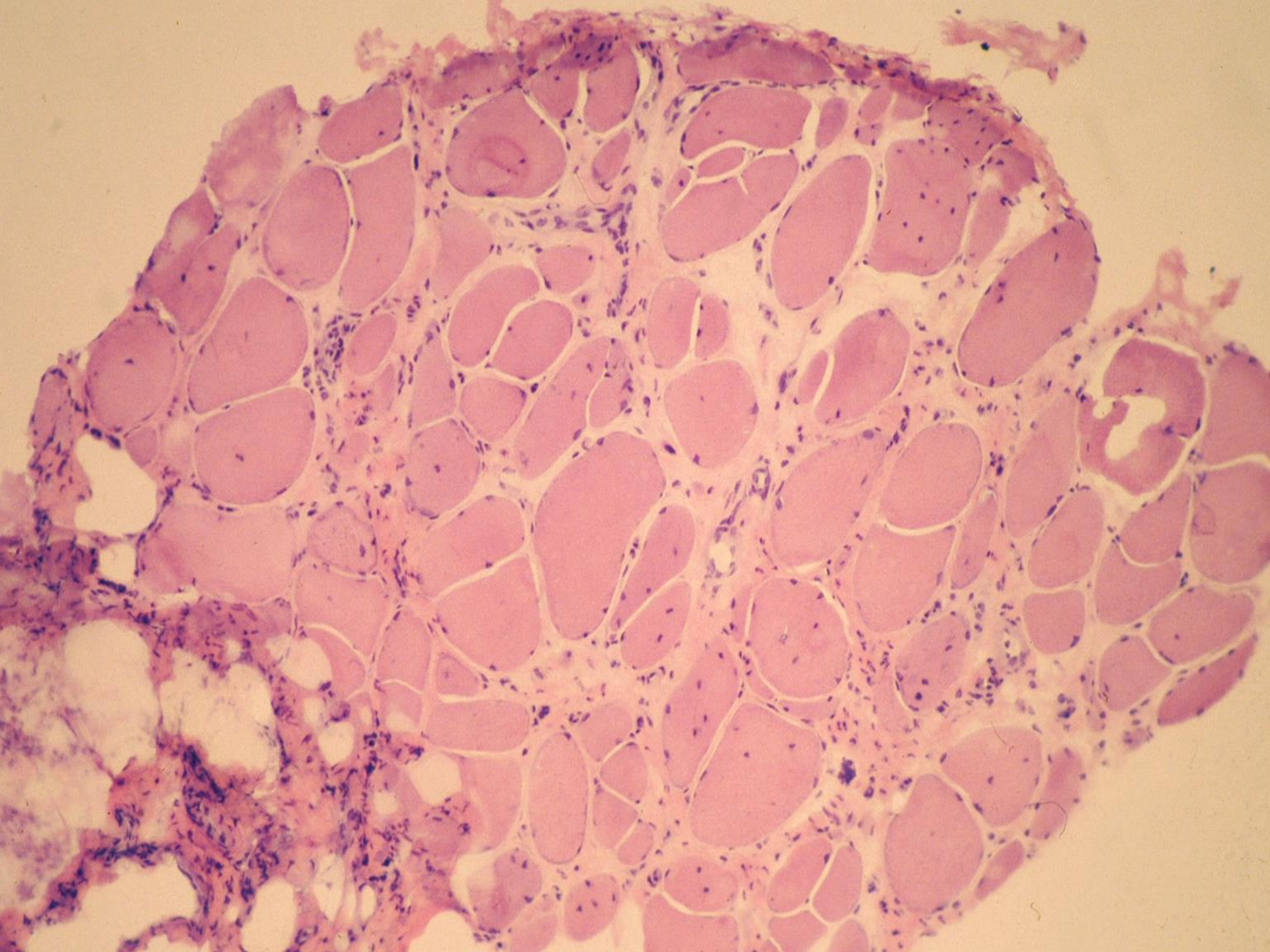
Miopatía nemalínica

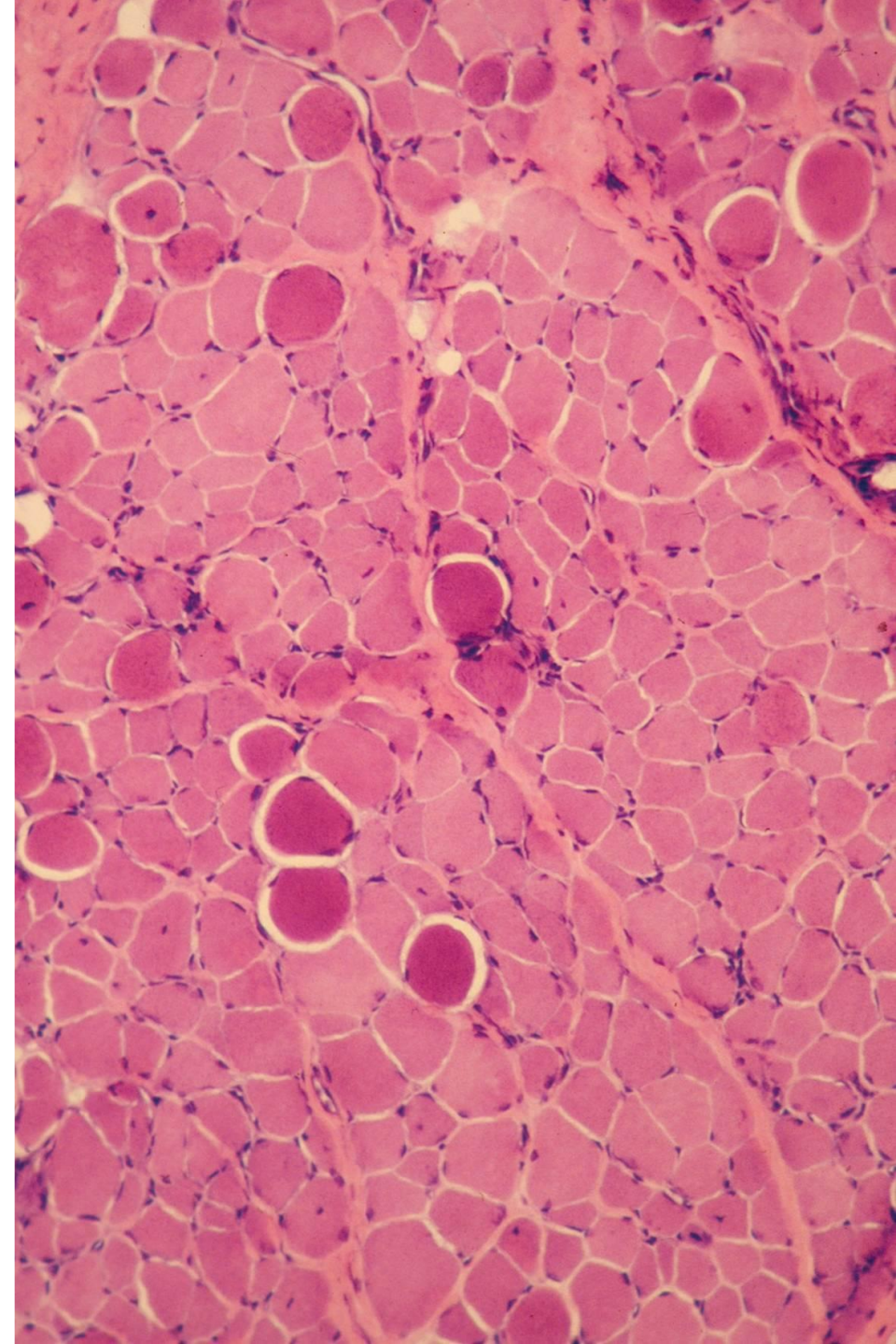
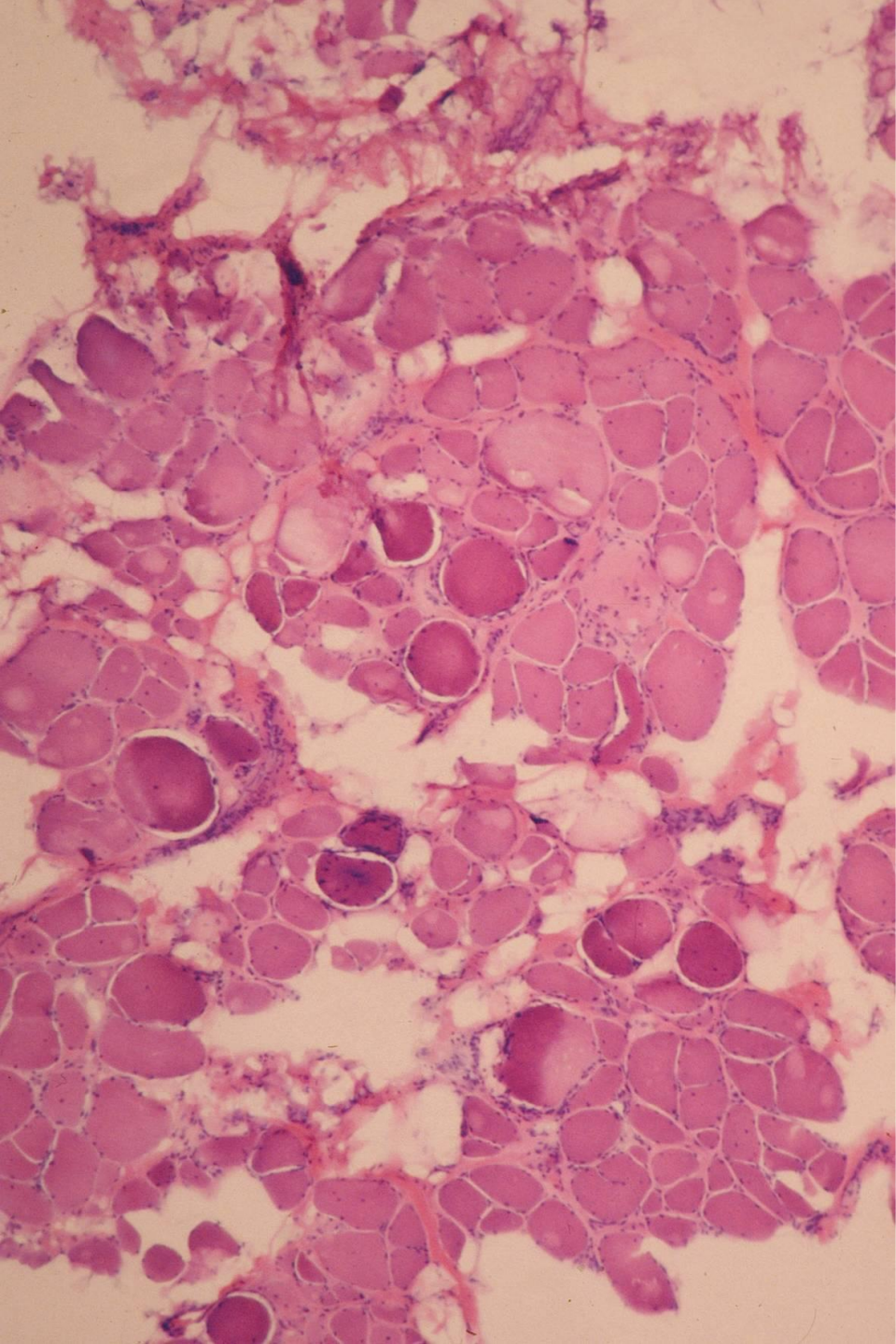
DISTROFIAS MUSCULARES

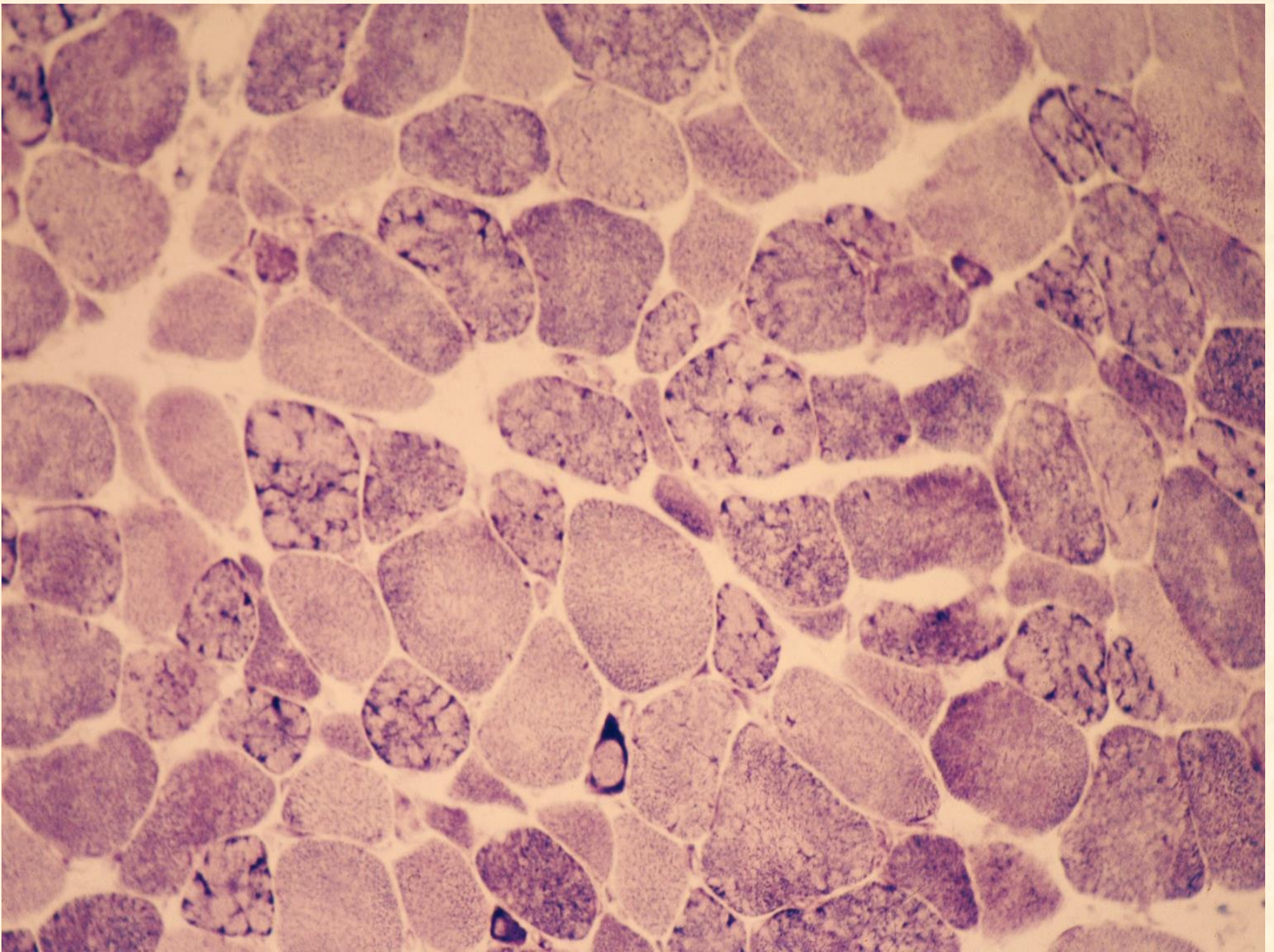
DISTROFIAS MUSCULARES

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



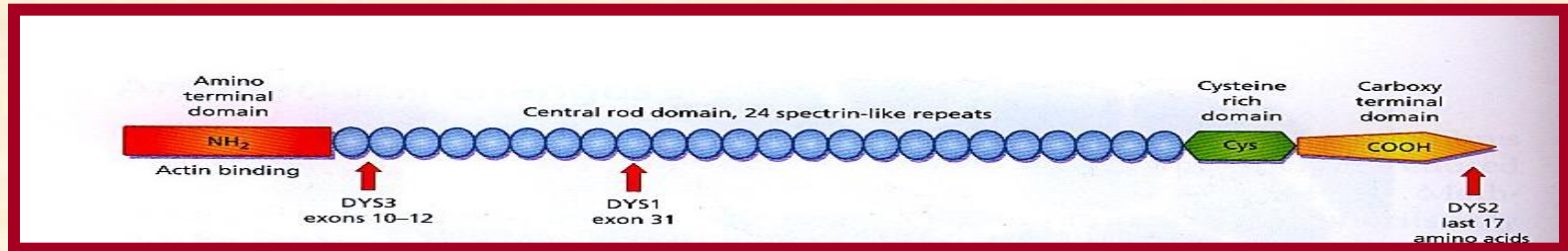






Fibras lobuladas (NDH-TR)

GEN DE LA DISTROFINA



- Hoffman EP, Brown RH Jr., Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928

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

Carolina Tesi Rocha · Eric P. Hoffman

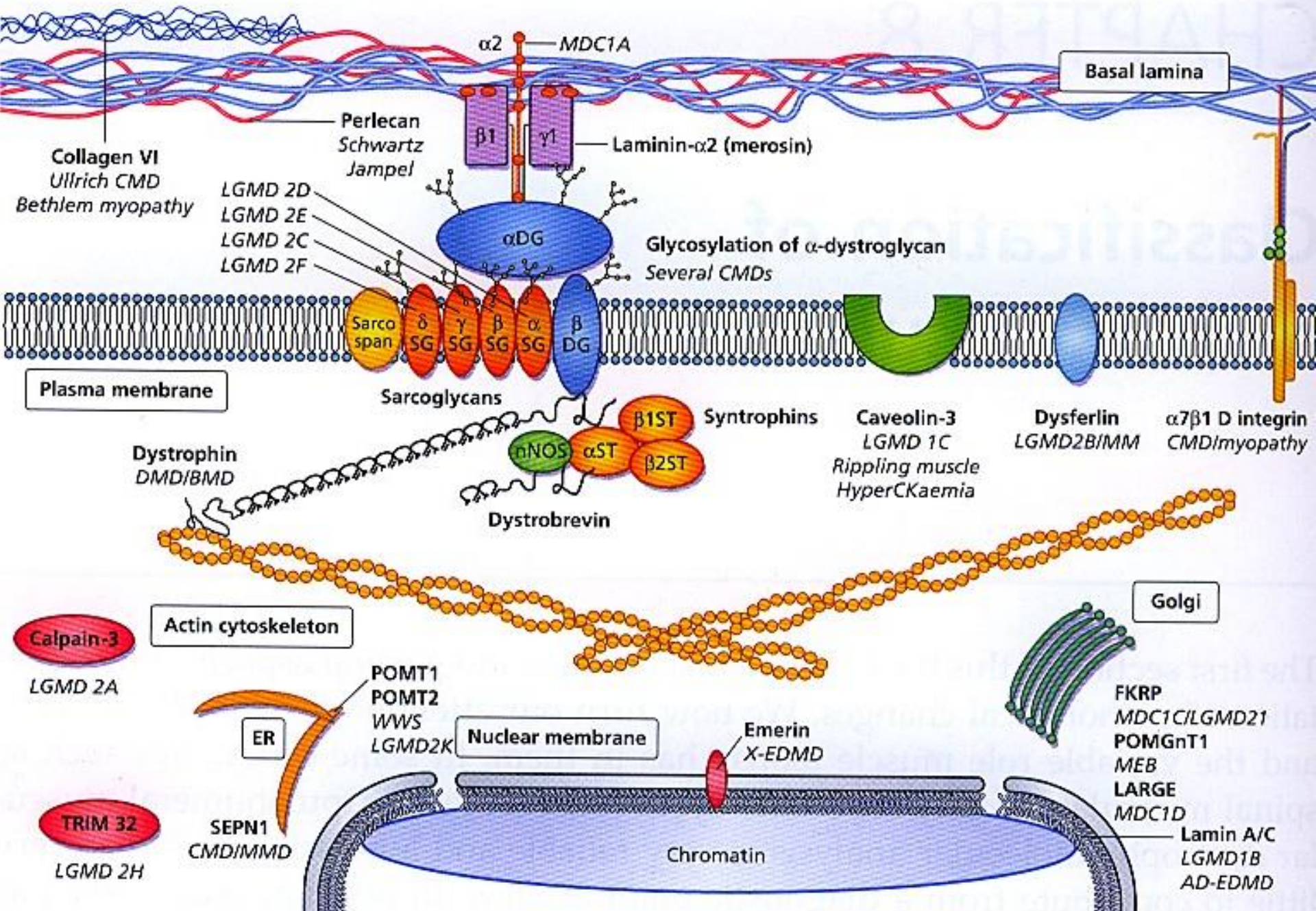
Published online: 14 May 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

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

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

Introduction and Internet Resources

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



TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

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

ENFERMEDAD

ANTICUERPO

Distrofinopatías **Distrofina (DYS1, DYS2,DYS3)**

Miopatías de cinturas

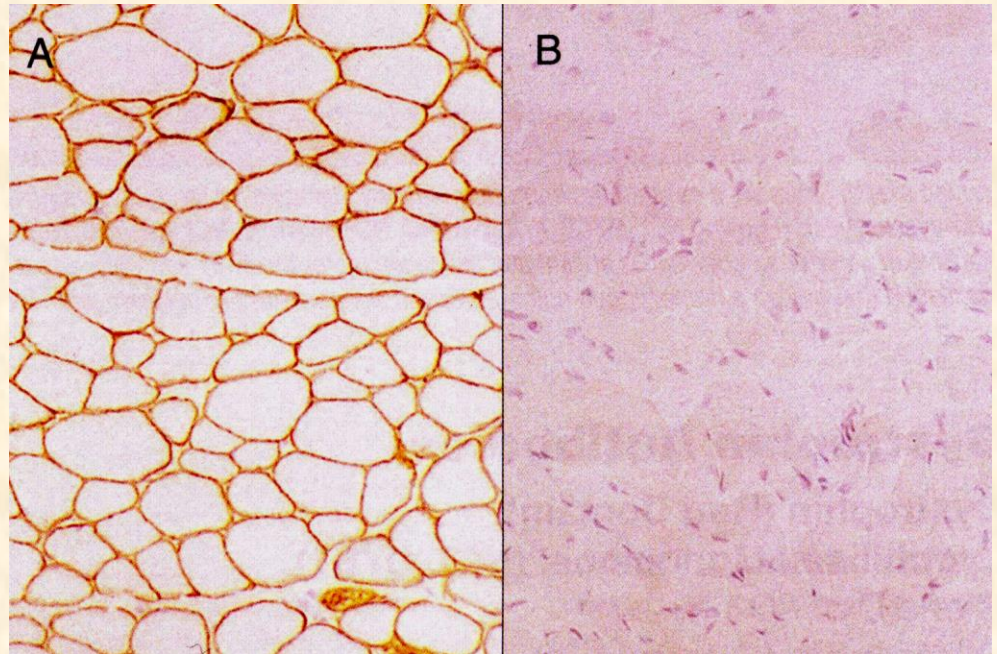
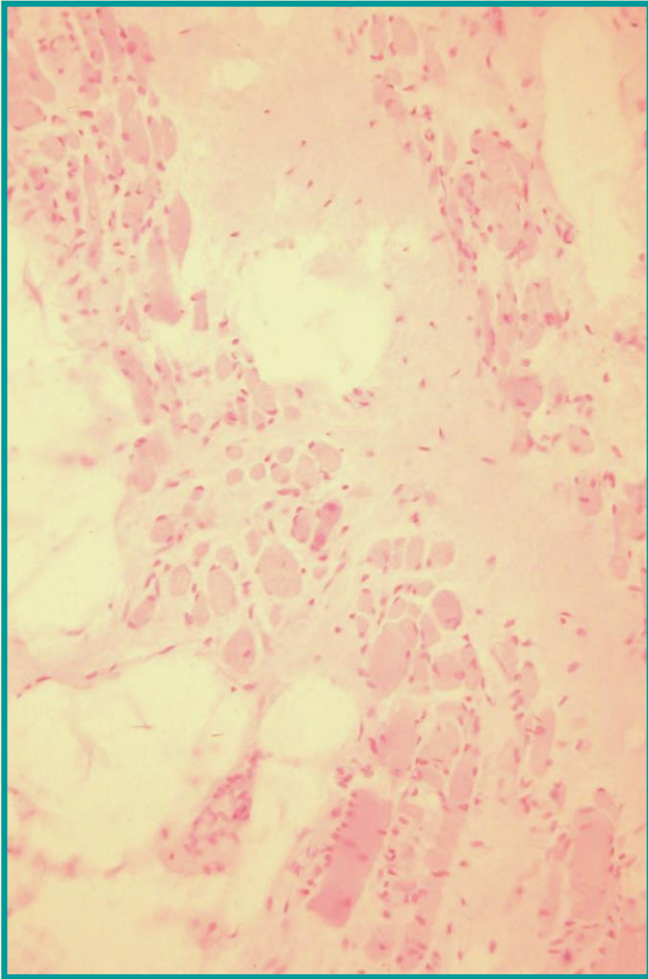
DC1A VR-Infiltrado inflamatorio..... **Miotilina**
DC1B Hipotonía neonatal..... **Lamina A/C** (<2° de laminina β 1)
DC1C **Caveolina3**

DC2A EM inicio adolesc. II eosin. FL..... **Calpaina (w-B)**
DC2B II linfocitario... **Disferlina**
DC2C **Gamma-sarcoglicano**
DC2D **Alfa-sarcoglicano**
DC2E **Beta-sarcoglicano**
DC2F **Delta-sarcoglicano**
DC2G **Teletonina**
DC2H **TRIM 32**
DC2I **FKRP** (<2° de laminina α 2 y α -dystroglicano)
DC2J **Titina**

Distrofia muscular congénita

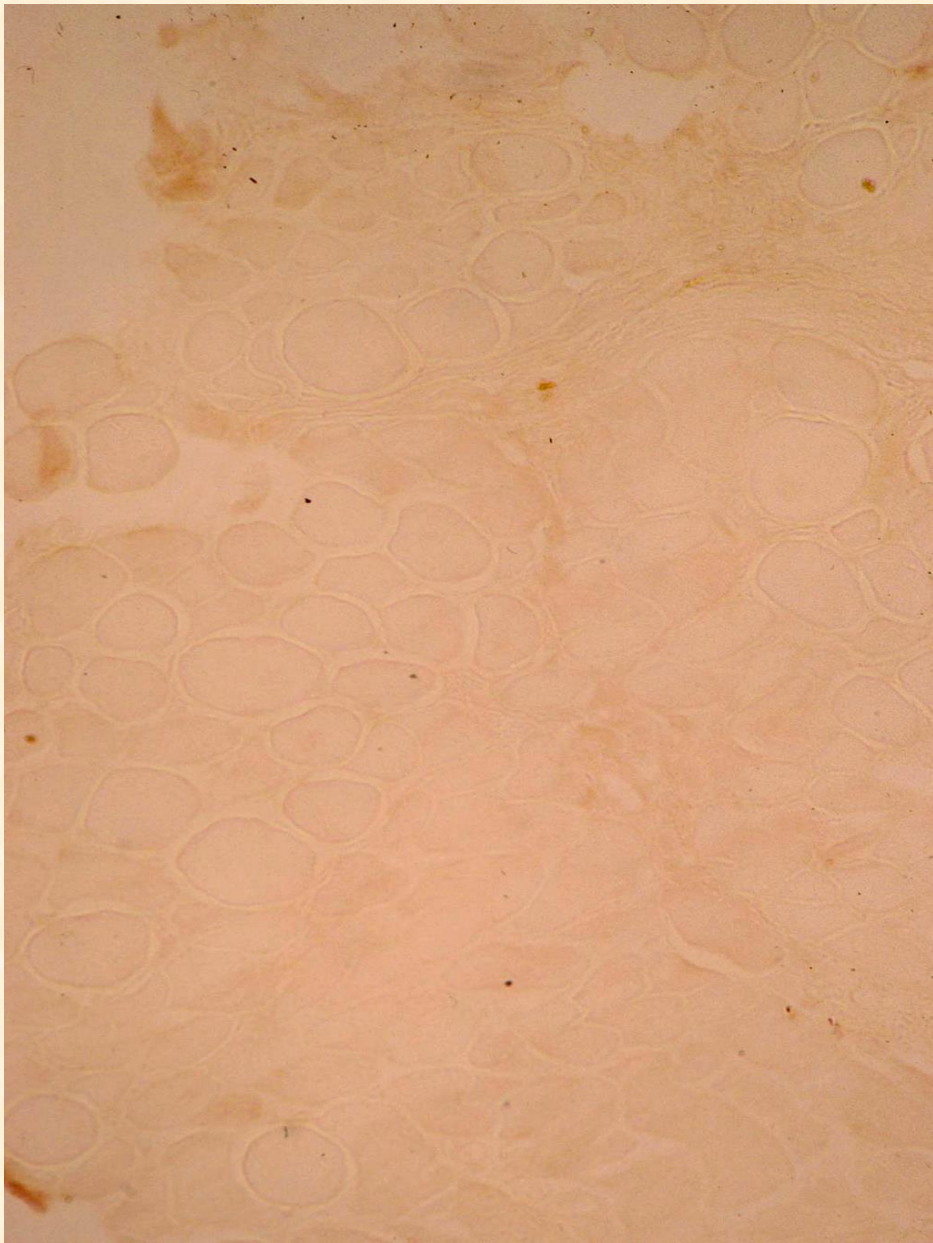
Anticuerpos anti:

- *Merosina*
- *ColágenoVI*
- *α -dystroglicano*

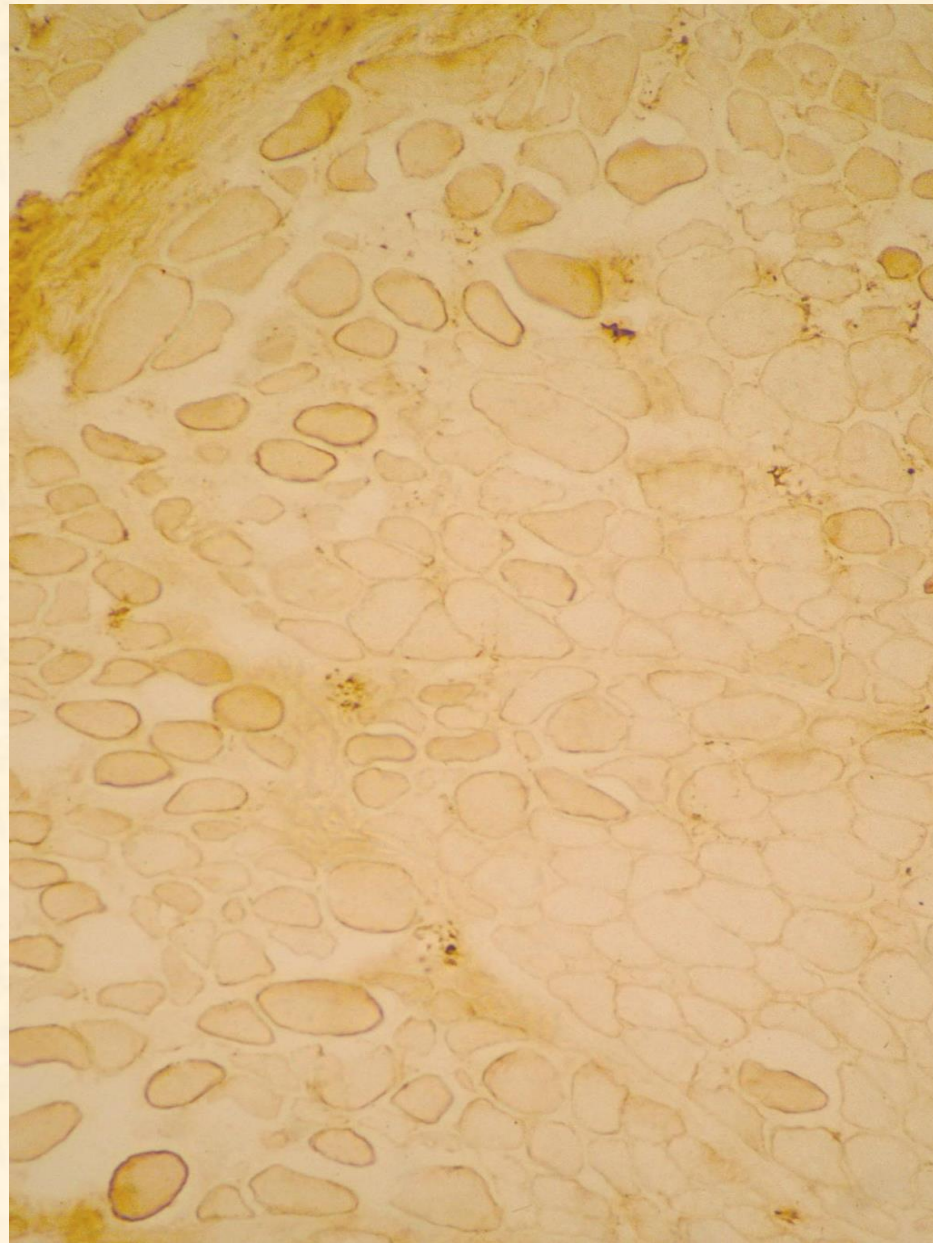


MEROSINA +

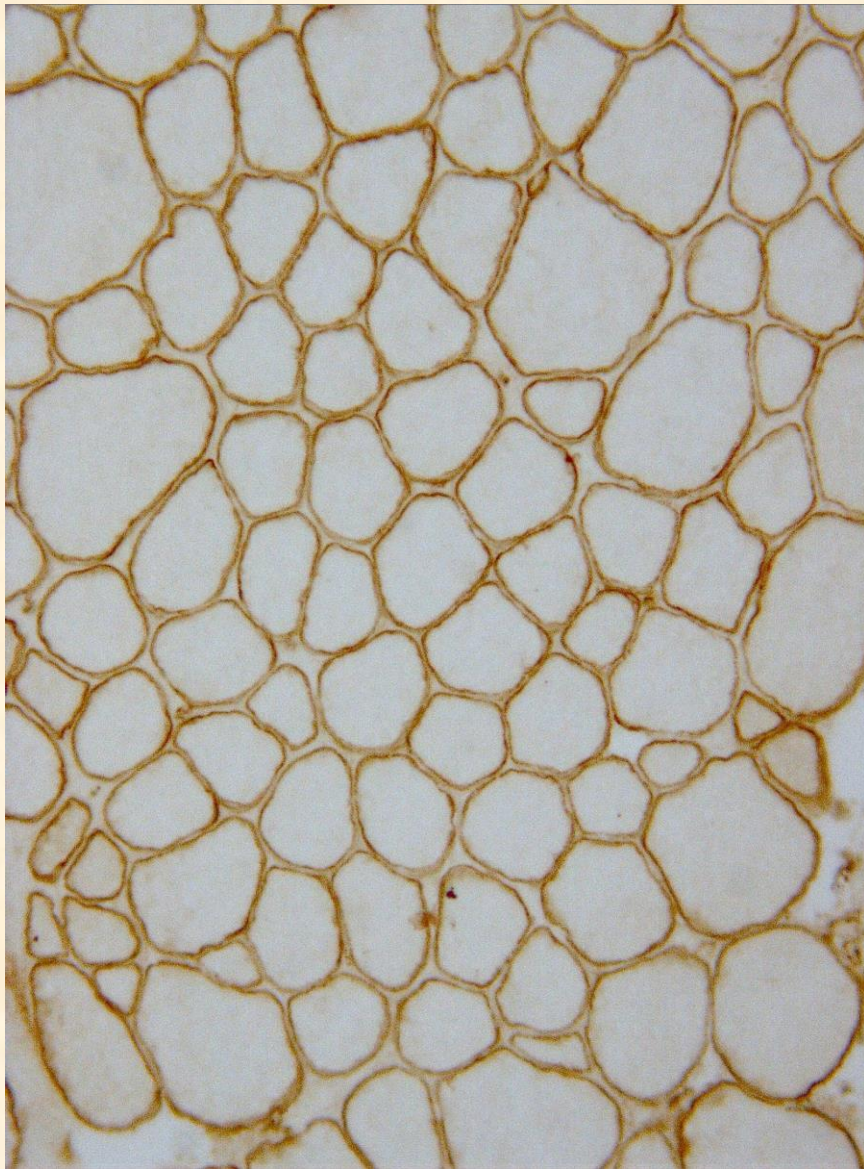
MEROSINA -



Distrofina-DMD

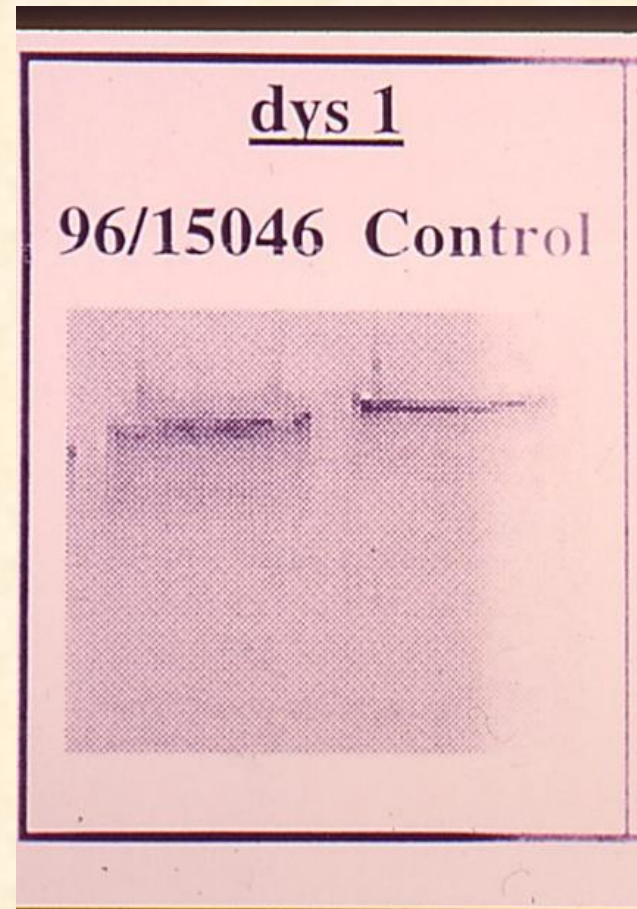


Distrofina-DMB

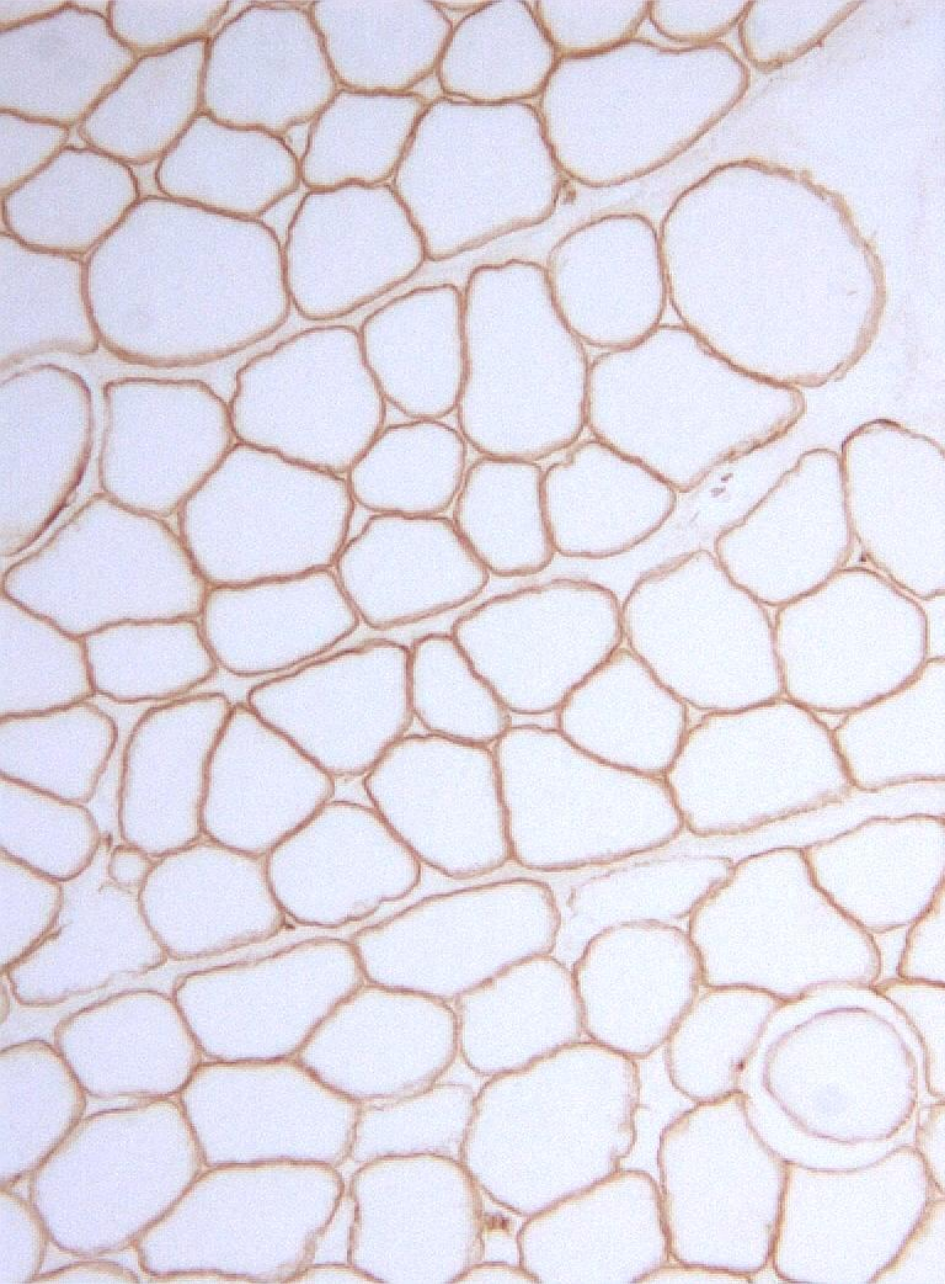


IHQ: distrofina Normal

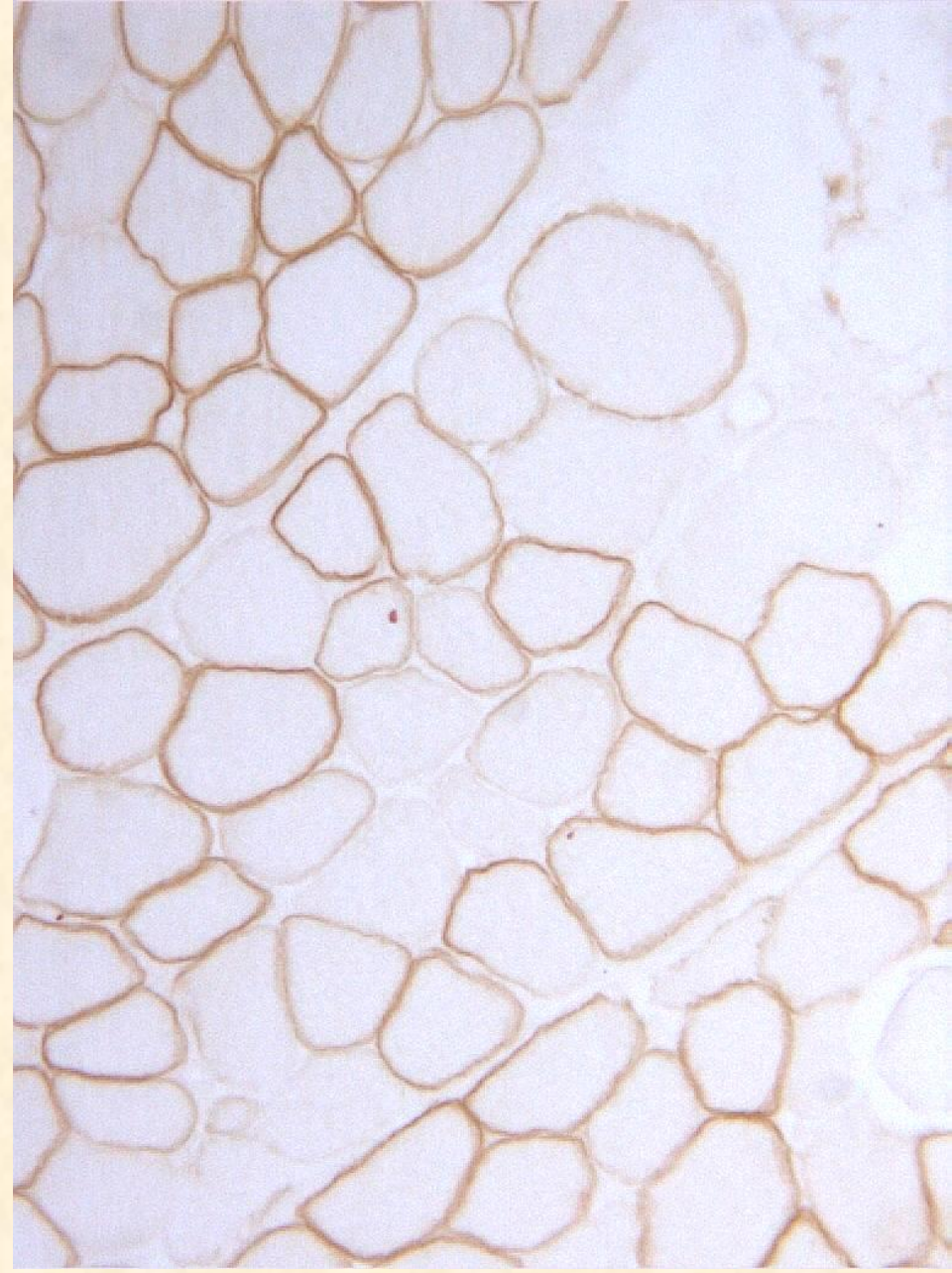
DMB



W-B distrofina: cantidad normal
y disminución del PM



ESPECTRINA



Portadora DMD

DISTROFINA

VALORACIÓN DE LAS ALTERACIONES IHQ

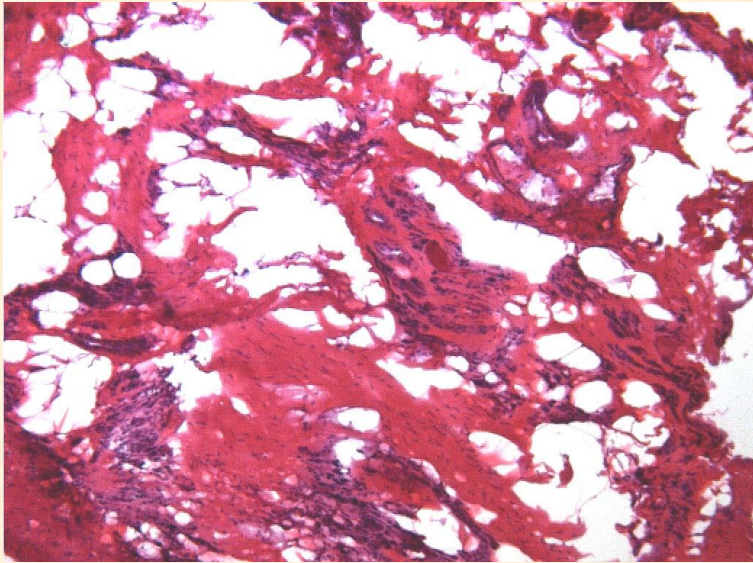
- *Debido a la interdependencia de las proteínas sarcolémicas y asociadas, la alteración primaria puede acompañarse de alteraciones secundarias en otras proteínas.*

Ejemplos de alteraciones secundarias:

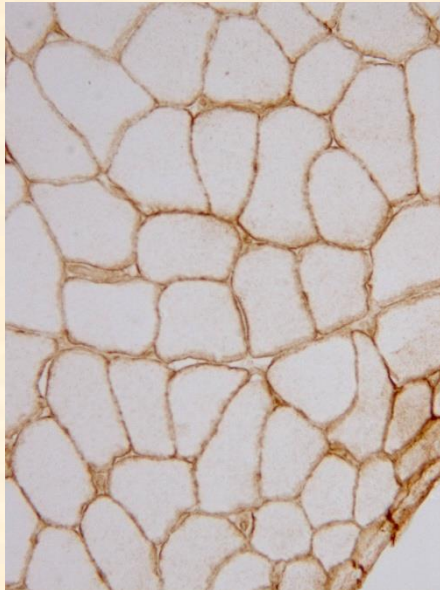
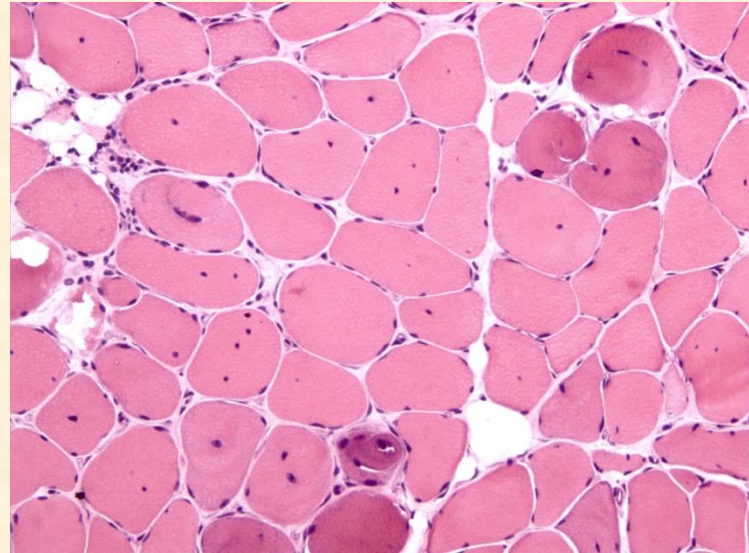
- En trastornos del complejo asociado a distrofina, puede haber alteraciones secundarias en todos o en muchos de los miembros del complejo*
- En la disferlina en casos de distrofinopatías y sarcoglicanopatías*
- En la calpaina 3 en casos de disferlinopatías*
- En la disferlina en casos de calpainopatías*
- *Confirmación del diagnóstico con W-B o con estudio genético*

DISFERLINOPATÍA

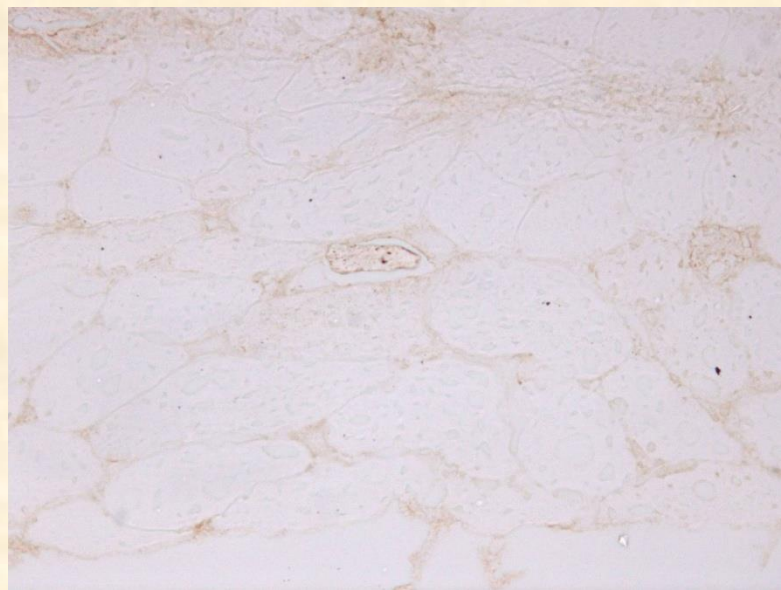
1ª biopsia



2ª biopsia



Disferlina-control



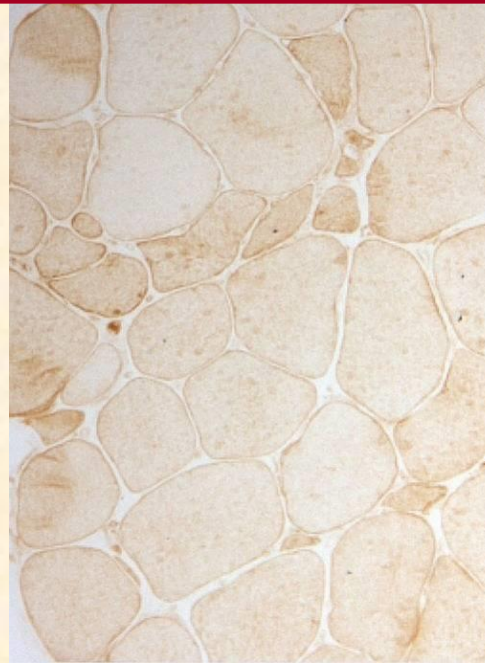
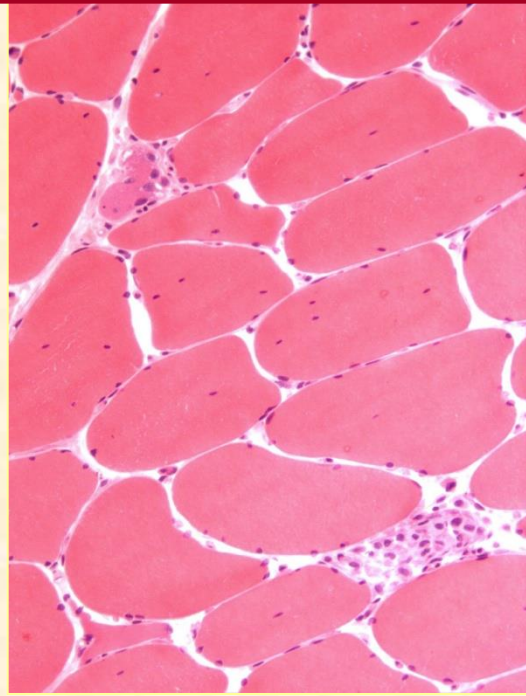
Disferlina

- Mujer de 29 años con sint. desde los 16 años
- Pérdida progresiva de fuerza en MMII
- EMG miopático

Western Blot:

- Déficit total de disferlina
- Calpaina 3 normal

DC2A (Calpainopatía)



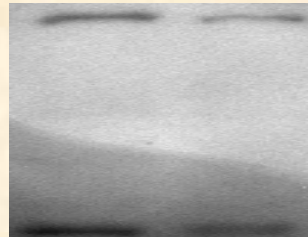
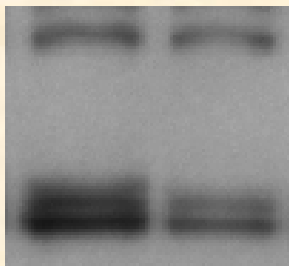
Disferlina



Disferlina-control

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

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



Western Blot de disferlina normal

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

Western Blot

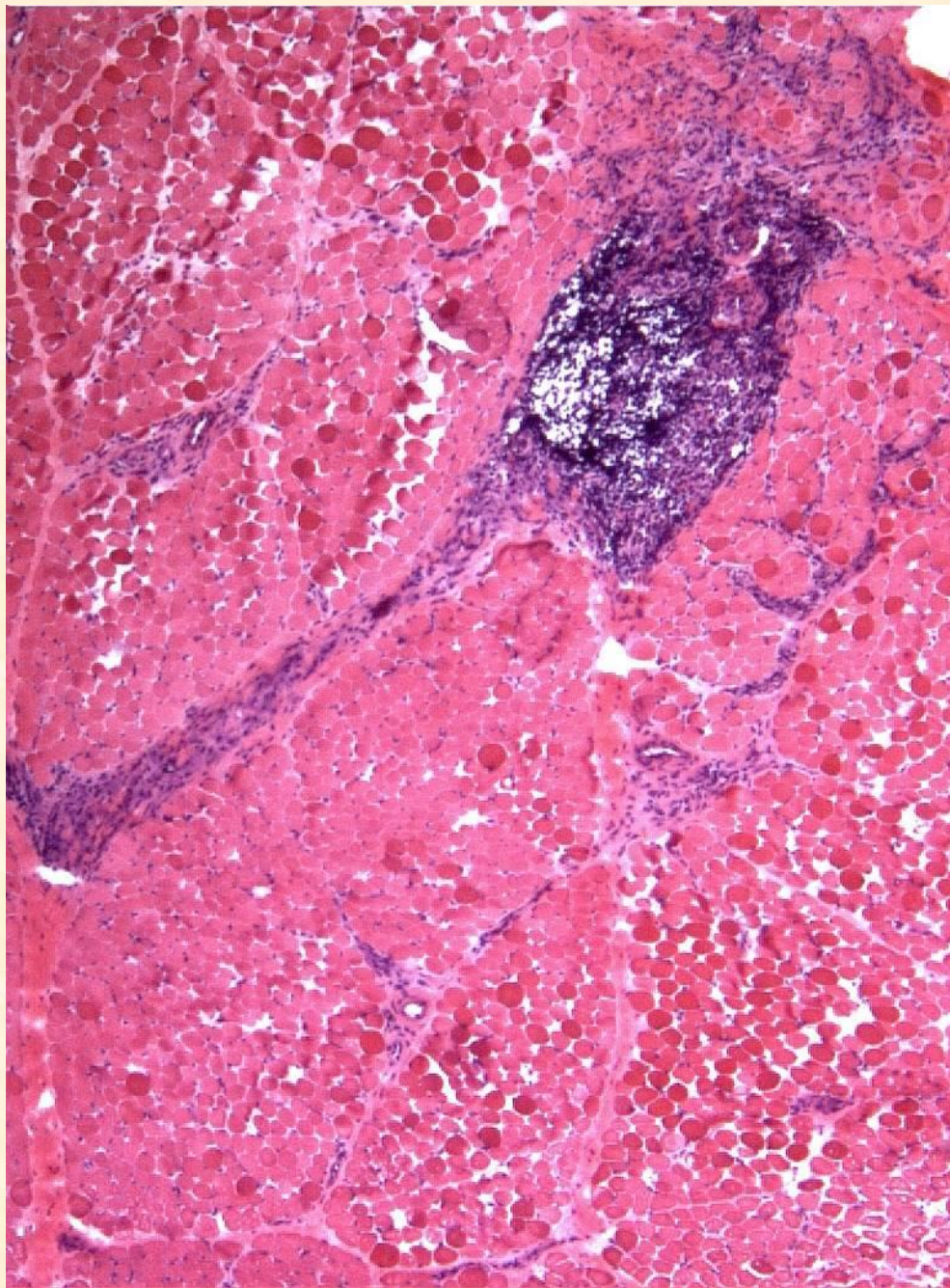
- *En determinados casos una proteína normal en el Western Blot no descarta la patología sospechada clínicamente, debiéndose hacer estudio genético.*

INFILTRADOS INFLAMATORIOS EN DISTROFIAS MUSCULARES

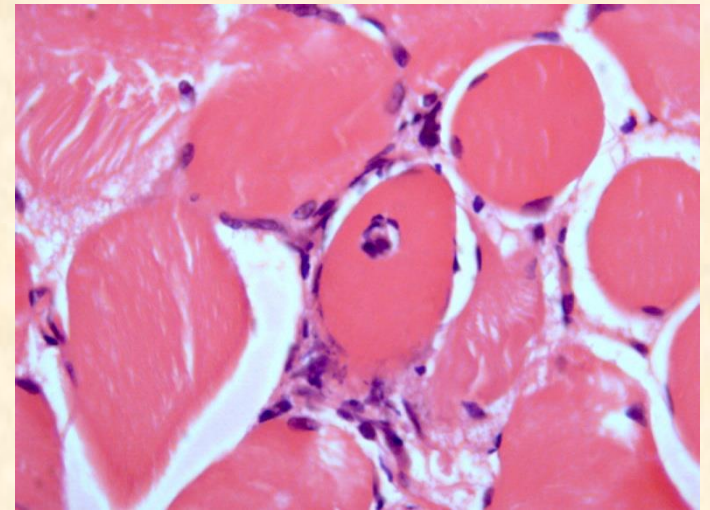
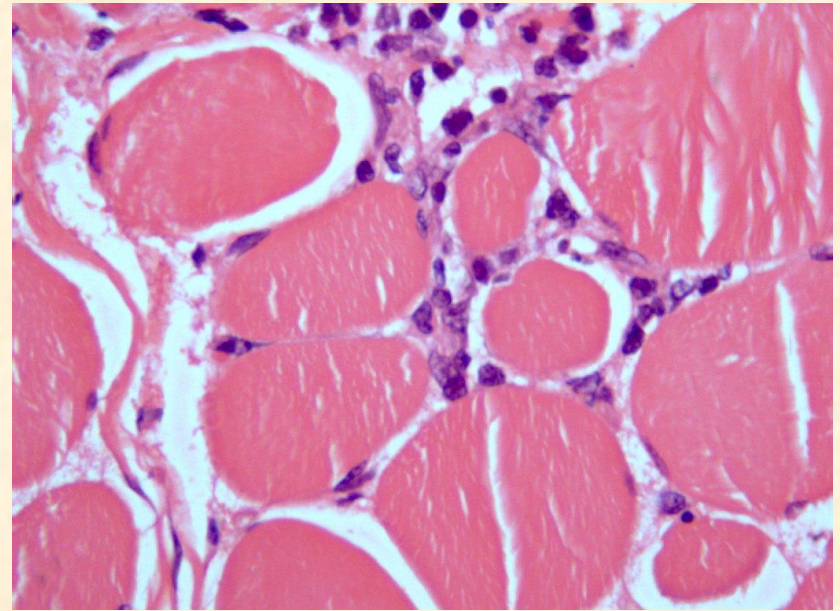
Los infiltrados inflamatorios en la biopsia muscular:

- *No son exclusivos de Miopatías Inflamatorias*

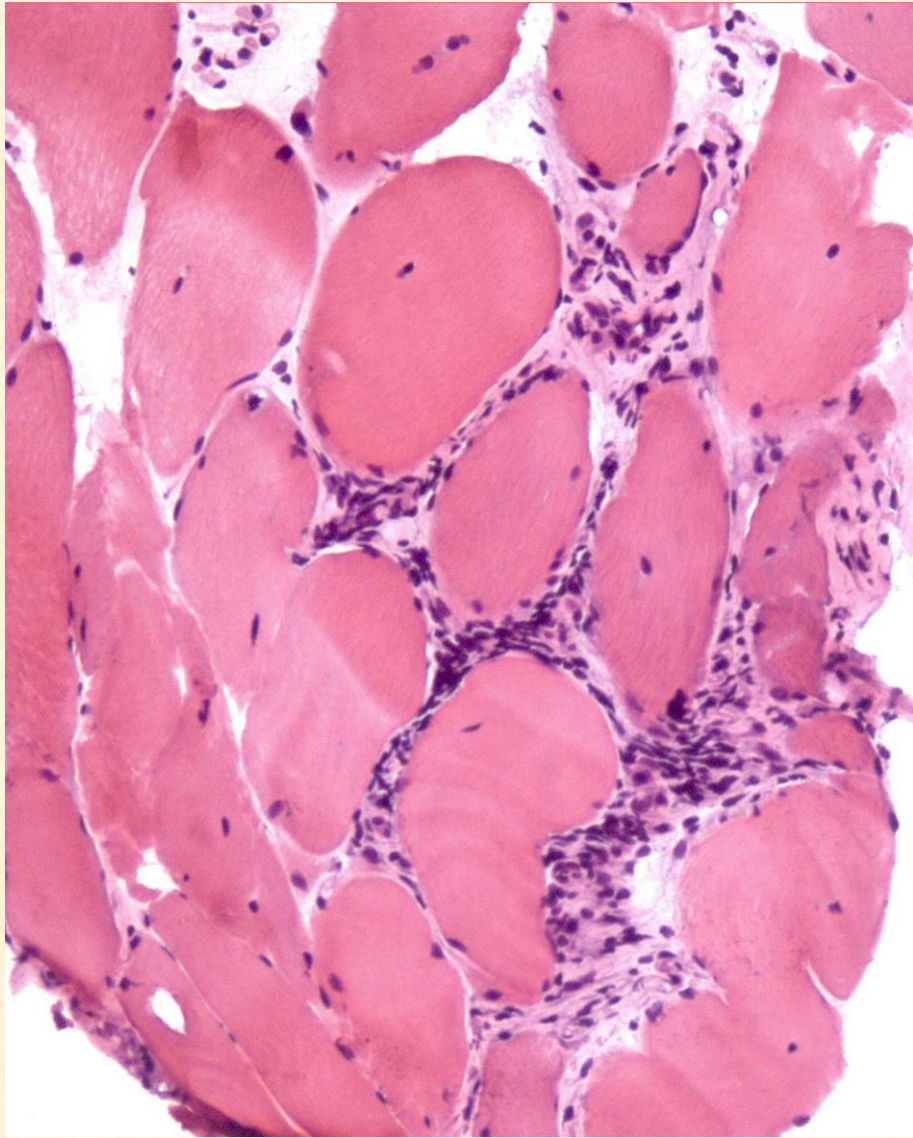
- *Pueden verse en distrofias musculares:*
 - DMD y DMB,
 - Déficit de Lamina A/C (Emery-Dreifuss)
 - Disferlinopatías
 - Calpainopatías,
 - Distrofia Muscular Cogénita,
 - Distrofia facio-escapulo-humeral



D.M. Congénita con infiltrado inflamatorio

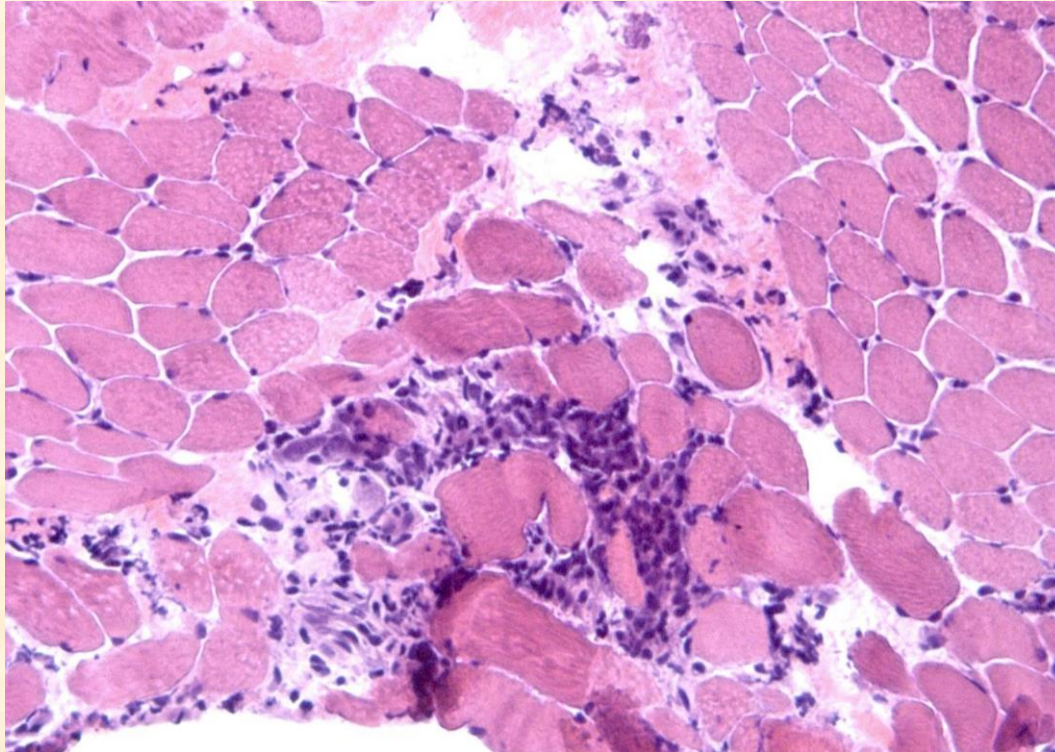


Distrofinopatía con infiltrado inflamatorio



Disferlinopatía

Calpainopatía



Varón:

- A los 14 años diagnosticado de MI y tratado con corticoides.
- Empeoramiento a los tres años, valorándose de nuevo el caso con diagnóstico de posible distrofia muscular.
- **WB: déficit de calpaína.**

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

- *Su estudio es complejo y requiere un buen procesamiento de la biopsia y la realización de técnicas especiales: Histoquímicas, Inmunohistoquímicas, Western blot y ME.*
- *Puede ser diagnóstica, mostrar cambios inespecíficos o plantear diagnósticos diferenciales entre distintos procesos.*
- *La correlación clinicopatológica es fundamental para el diagnóstico y con frecuencia son necesarias otras pruebas diagnósticas (cadena respiratoria mitocondrial, estudio genético, etc).*

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

Carolina Tesi Rocha · Eric P. Hoffman

Published online: 14 May 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

synopsis of the 45 genetically defined types of muscular dystrophies and describes the clinical, pathologic, and molecular aspects of each disease. DNA diagnosis remains the most sensitive and specific method for differential diagnosis, but molecular diagnostics can be expensive and complex (because of multiple genes at multiple testing facilities) and reimbursement may be challenging to obtain. However, emerging DNA sequencing technologies (eg, single-molecule third-generation sequencing units) promise to dramatically reduce the complexity and costs of DNA diagnostics. Treatment for nearly all forms remains supportive and is aimed at preventing complications. However, several promising approaches have entered clinical trials, providing tangible hope that quality of life will improve for many patients in the near future.

C. Tesi Rocha (✉) · E. P. Hoffman
Research Center for Genetic Medicine, Division of Neurology,
Department of Pediatrics, Children's National Medical Center,
111 Michigan Avenue Northwest,
Washington, DC 20010, USA
e-mail: ctesiroc@cnmc.org

Introduction and Internet Resources

Muscular dystrophies are a group of inherited primary diseases of muscle, characterized pathologically by muscle fiber degeneration and clinically by muscle weakness. Classification of muscular dystrophies traditionally has been based on pathologic, clinical, and inheritance patterns (recessive, dominant, X-linked). Over the past 25 years, gene mutation data have begun to dominate differential diagnostic methods (Tables 1 and 2). Molecular diagnostic techniques are now available for many of these disorders, although they may be challenging to implement in a systematic manner, and sequencing of multiple genes may be quite costly, with slow turnaround times. However, sequencing technologies are evolving quickly, and it may be possible within the next year or two to sequence all muscular dystrophy genes, or even the patient's entire genome, in a single test at low cost.

More in-depth coverage of the frequencies, clinical features, gene mutations, and genetic counseling of the limb–girdle muscular dystrophies (LGMDs) and congenital muscular dystrophies (CMDs) may be found at the National Institutes of Health–supported Gene Reviews website (LGMD: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=lgmd-overview>; CMD: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=cmd-overview>).

AUTOSOMAL RECESSIVE EMERY-DREIFUSS MUSCULAR DYSTROPHY CAUSED BY A NOVEL MUTATION (R225Q) IN THE LAMIN A/C GENE IDENTIFIED BY EXOME SEQUENCING

ADRIANO JIMENEZ-ESCRIG, MD, PhD,^{1,2} ISABEL GOBERNADO, MD,^{2,3} MERCEDES GARCIA-VILLANUEVA, MD, PhD,⁴ and ANTONIO SANCHEZ-HERRANZ, BS, PhD^{2,5}

¹ Servicio de Neurología, Hospital Ramon y Cajal and Universidad de Alcalá, 28034 Madrid, Spain

² Unidad Central de Apoyo a Estudios Genómicos, IRYCIS, Madrid, Spain

³ Servicio de Psiquiatría, Hospital Ramon y Cajal, Madrid, Spain

⁴ Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Ramon y Cajal, Madrid, Spain

⁵ Servicio de Neurobiología, Hospital Ramon y Cajal, Madrid, Spain

Accepted 10 October 2011

ABSTRACT: *Introduction:* The aim of this study is to describe a new mutation in the *LMNA* gene diagnosed by whole exome sequencing. *Methods:* A two-generation kindred with recessive limb-girdle muscular dystrophy was evaluated by exome sequencing of the proband's DNA. *Results:* Exome sequencing disclosed 194,618 variants (170,196 SNPs, 8482 MNPs, 7466 insertions, 8307 deletions, and 167 mixed combinations); 71,328 were homozygous and 123,290 were heterozygous, with 11,753 non-synonymous, stop-gain, stop-loss, or frameshift mutations occurring in the coding region or nearby intronic region. The cross-referencing of these mutations in candidate genes for muscular dystrophy showed a homozygous mutation c.G674A in exon 4 of *LMNA* causing a protein change R225Q in an arginine conserved from human to *Xenopus tropicalis* and in lamin B1. *Conclusions:* This technique will be preferred for studying patients with muscular dystrophy in the coming years.

Muscle Nerve 45: 605–610, 2012

future, for inclusion of these patients in a gene therapy program.^{3,4}

Over the last year, development of the next generation of sequencing technology has progressively facilitated sequencing of the whole genome, or only the coding region (exome), which harbors 85% of disease mutations,⁵ in a time/cost frame suitable for application in the clinical setting.^{6,7} However, data on the use of this technique for clinical diagnosis are scarce, although recently a few reports have highlighted its potential impact.^{8,9} Herein we report the clinical and genetic data on a family with autosomal recessive Emery–Dreifuss muscular dystrophy caused by a novel mutation

La actualización permanente de la tabla de genes de enfermedades neuromusculares se publica periódicamente en la revista Neuromuscular Disorders, pudiéndose también acceder a ella en las direcciones:

<http://www.musclegenetable.org>

<http://194.167.35.195/>

MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN