



Hospital Universitario  
12 de Octubre

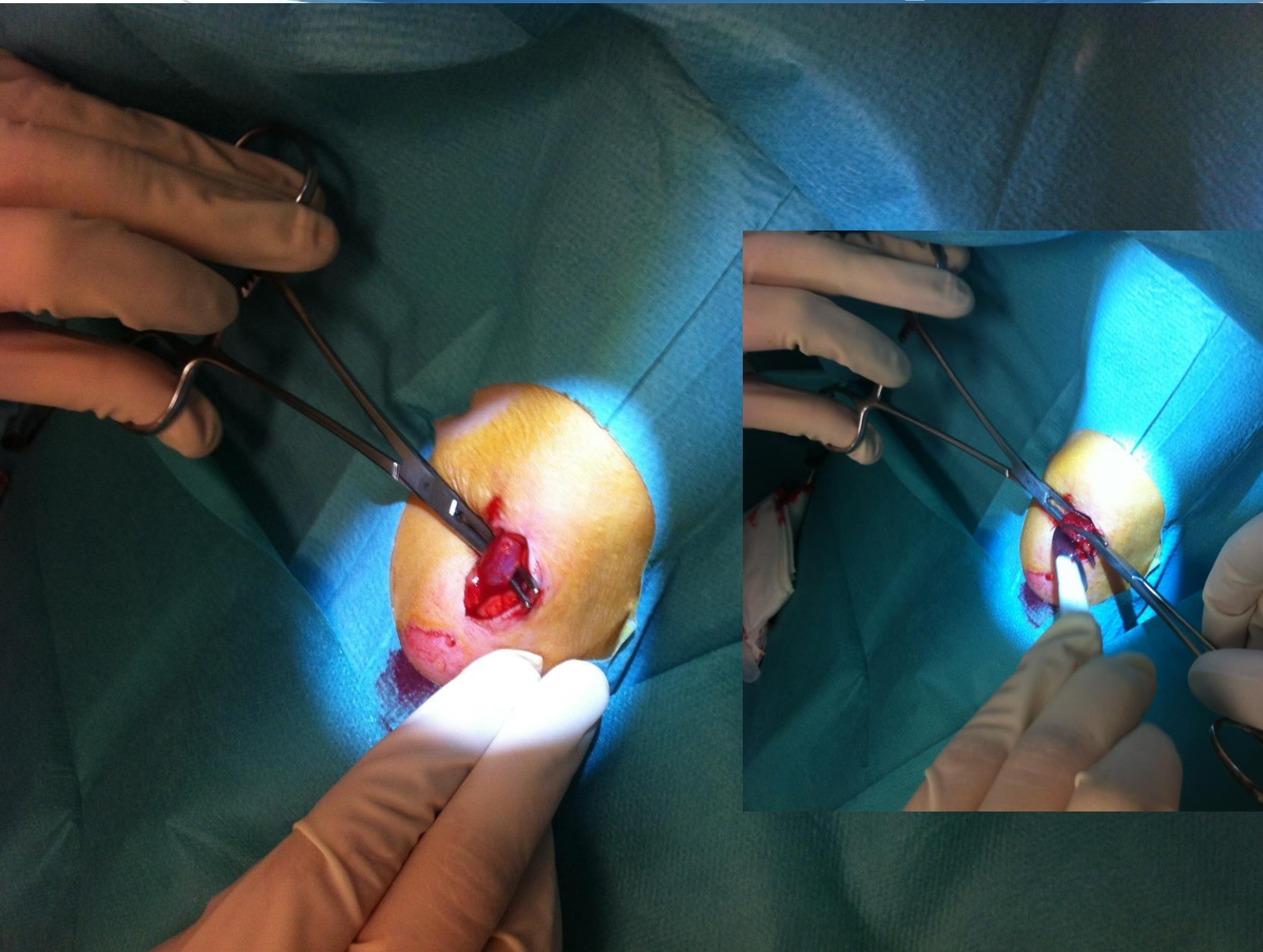
 Comunidad de Madrid



# ¿Que aporta la biopsia muscular al diagnóstico de las distrofinopatías?

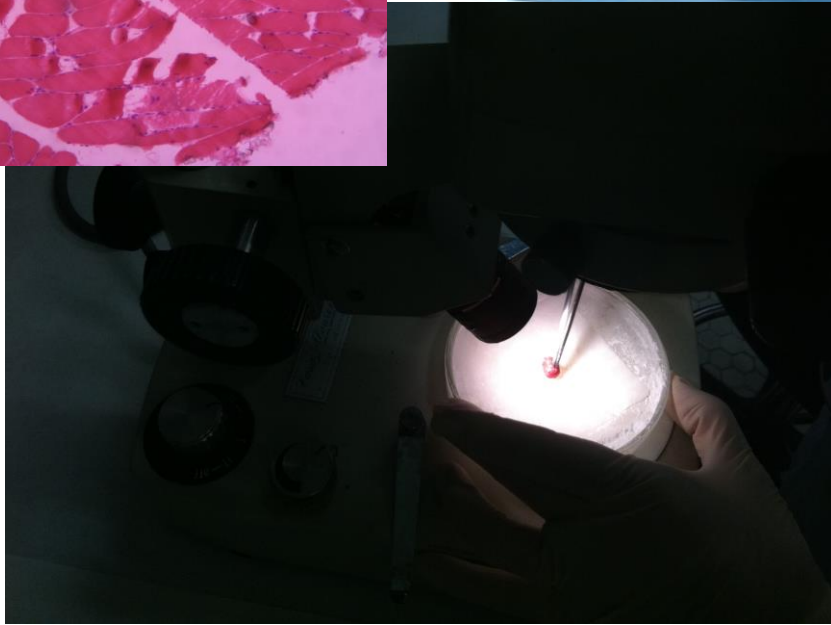
**Dr. Aurelio Hernández Laín**  
**Neuropatología**  
**Servicio Anatomía Patológica**  
**Hospital Universitario 12 de Octubre**

# Técnica biopsia

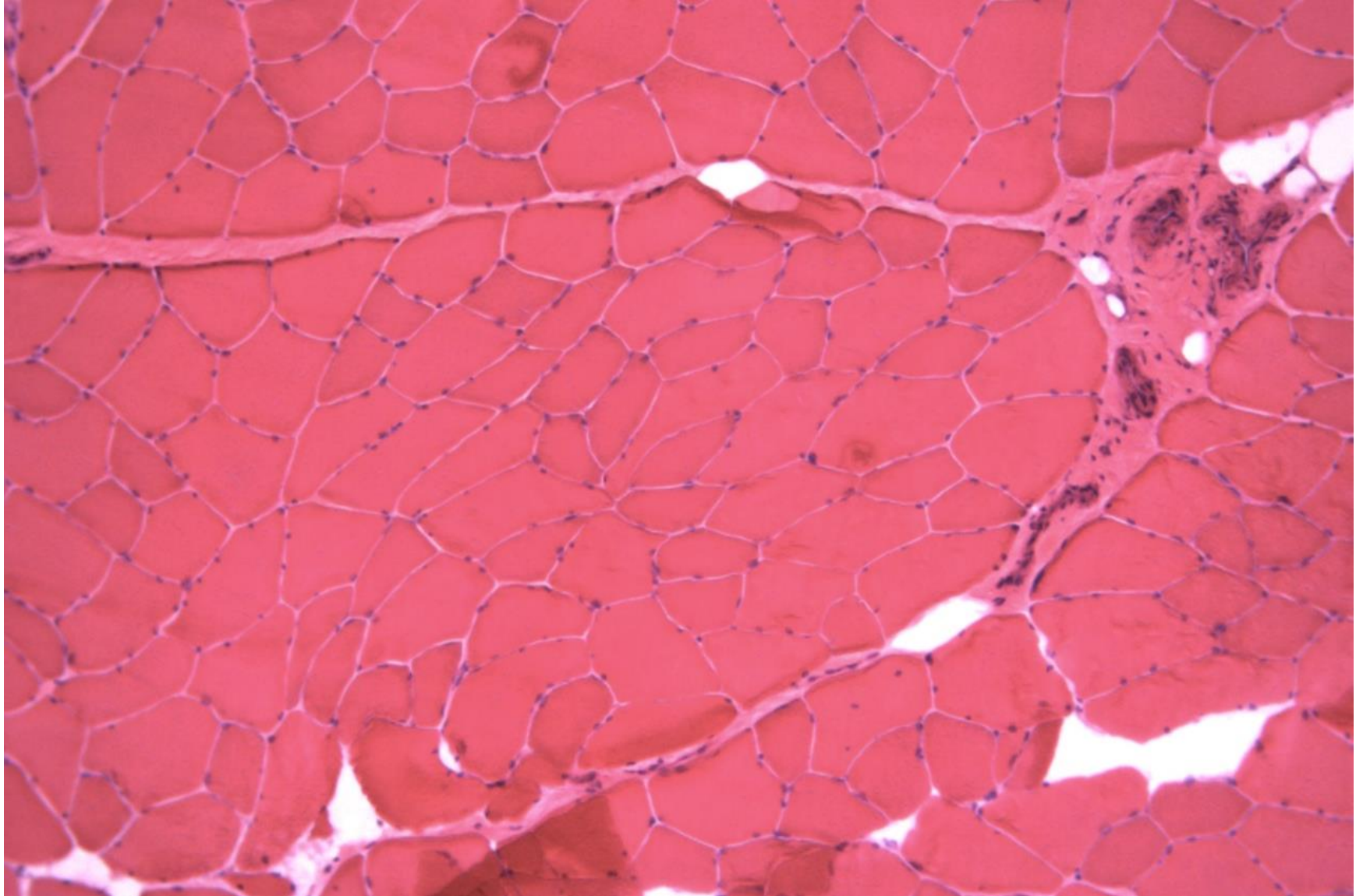




# Procesamiento

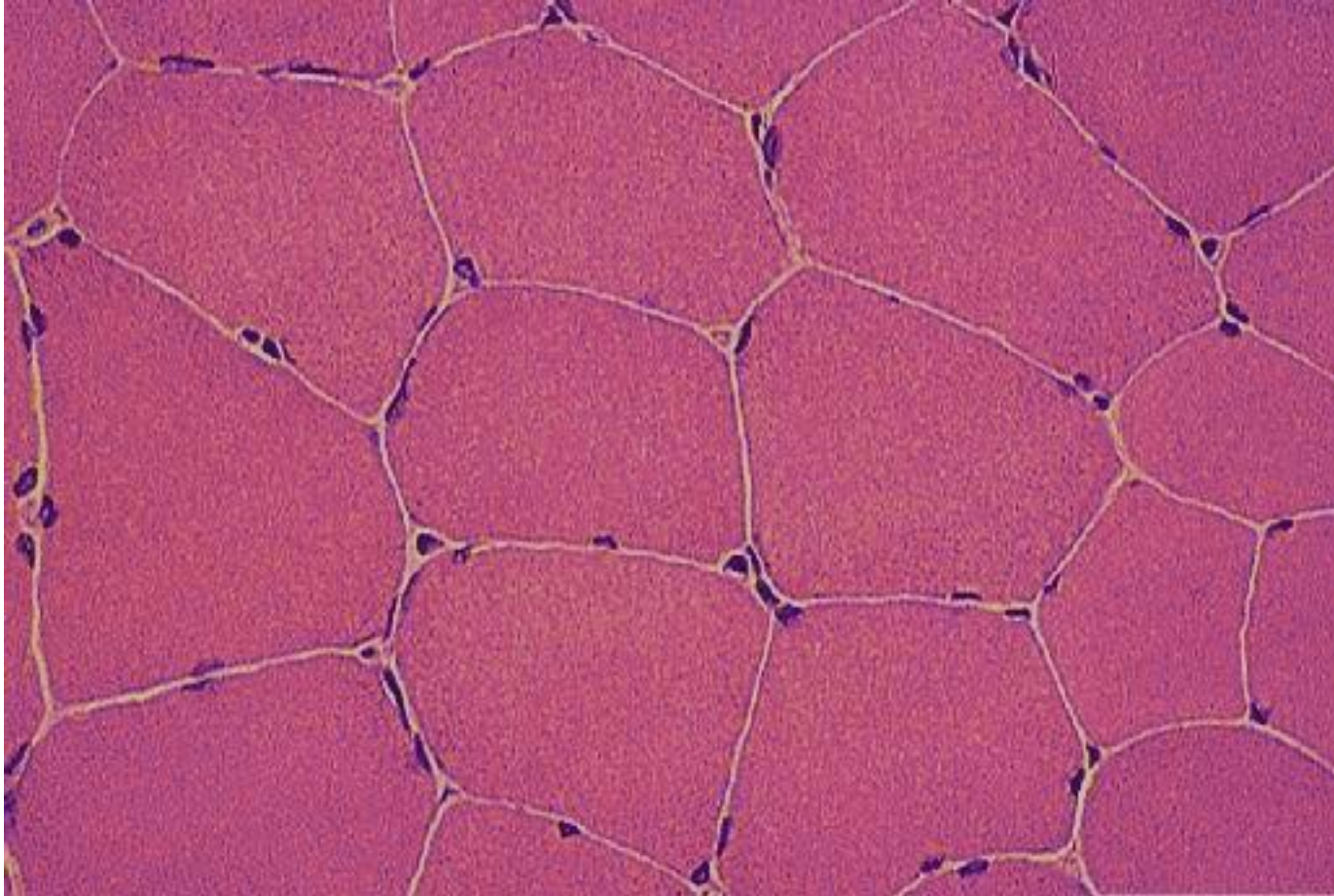


# Músculo normal

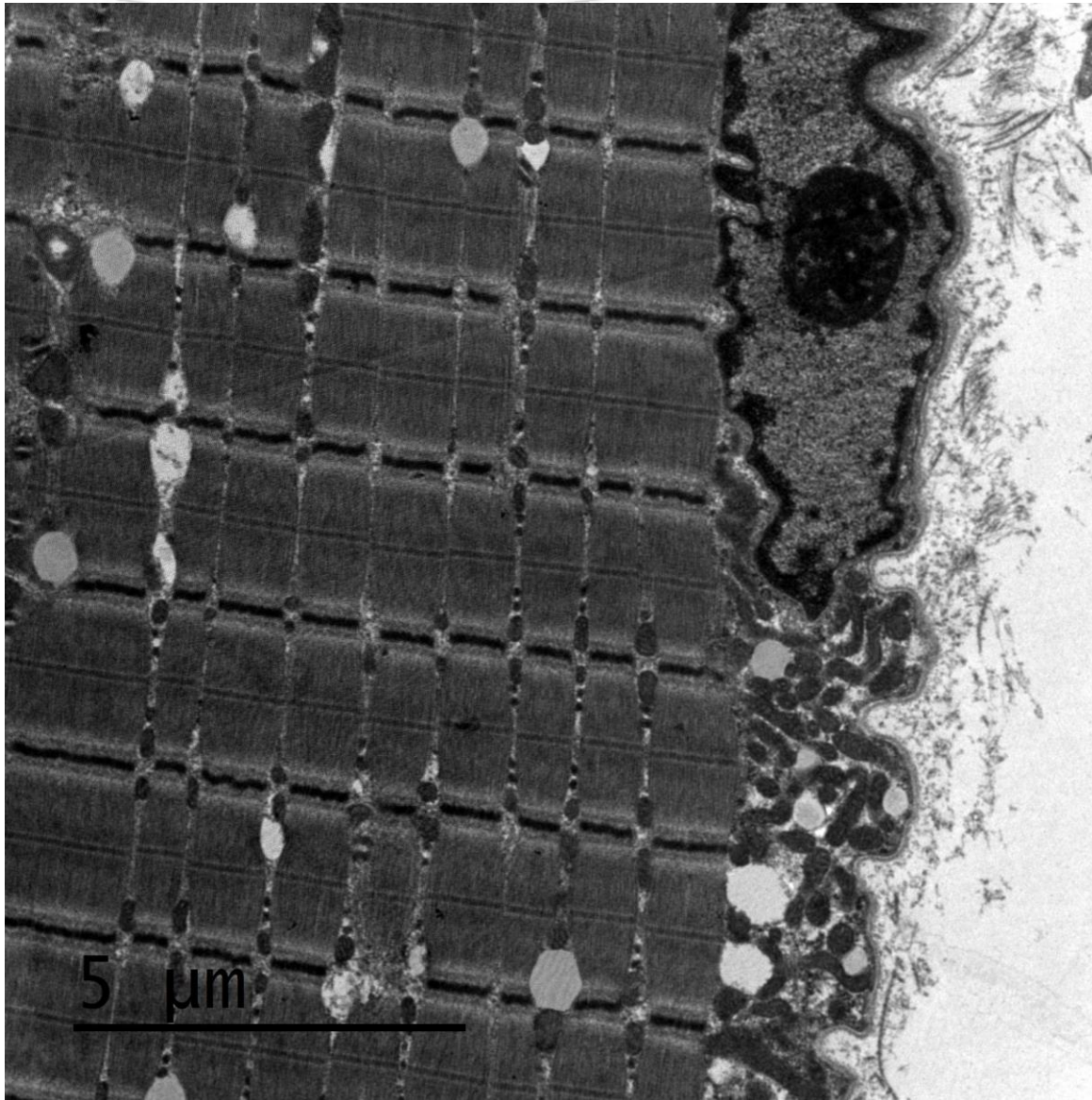




# Músculo normal



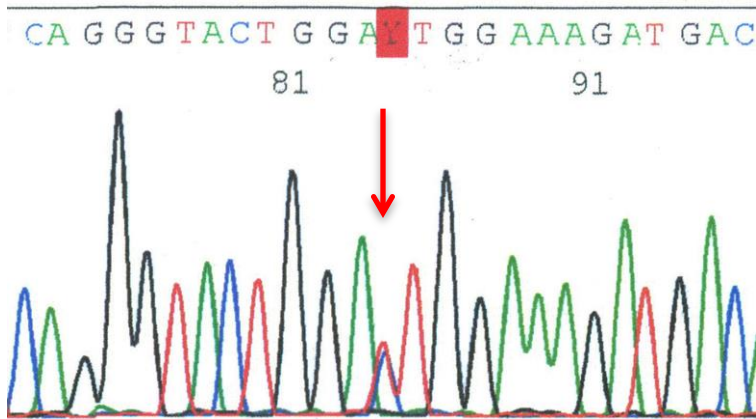
# Microscopia Electrónica







# Estudio genético



***Sanger***

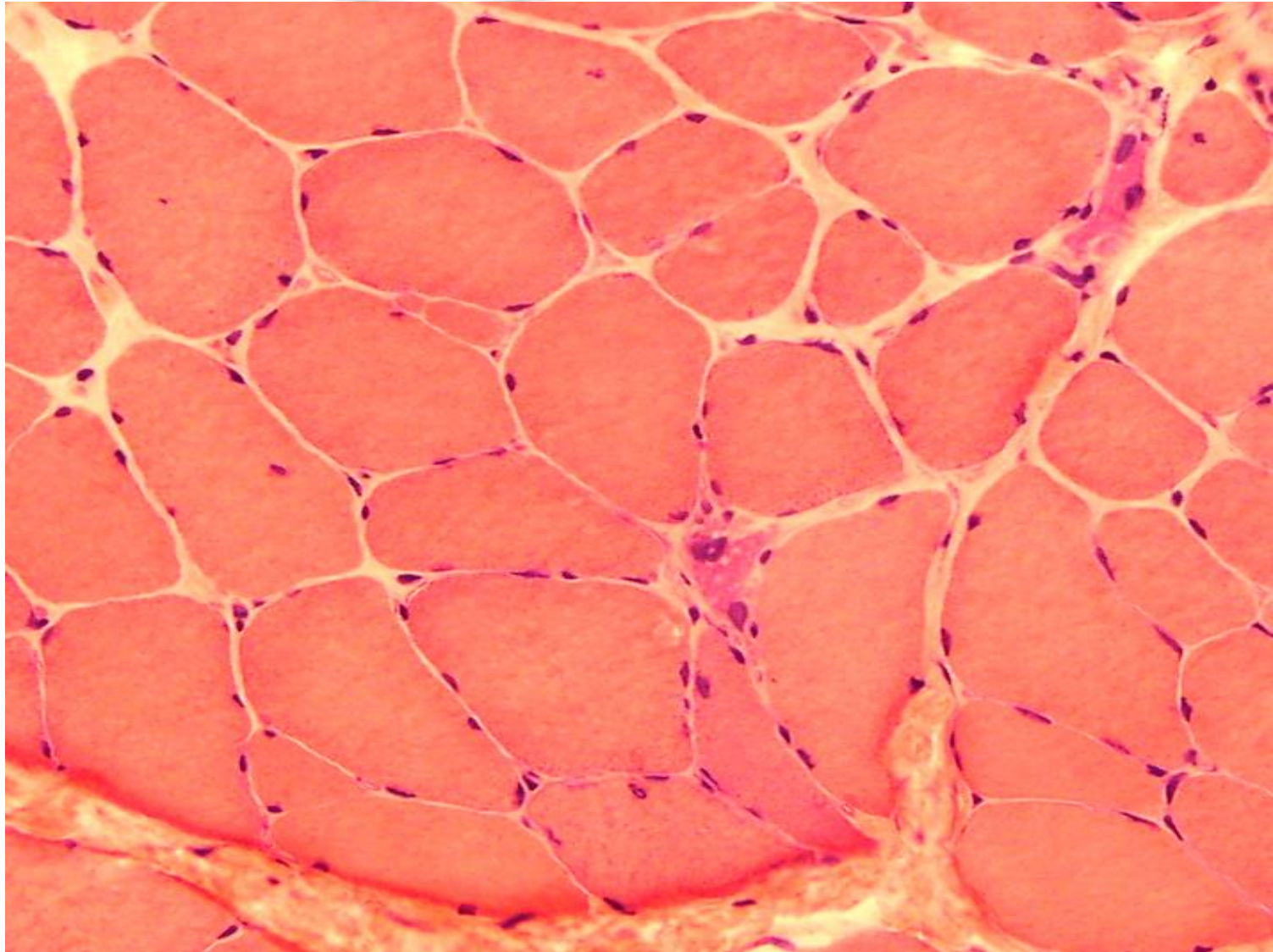


**NGS (Next Generation Sequencing)  
Paneles, Exoma y Transcriptoma, Genoma**



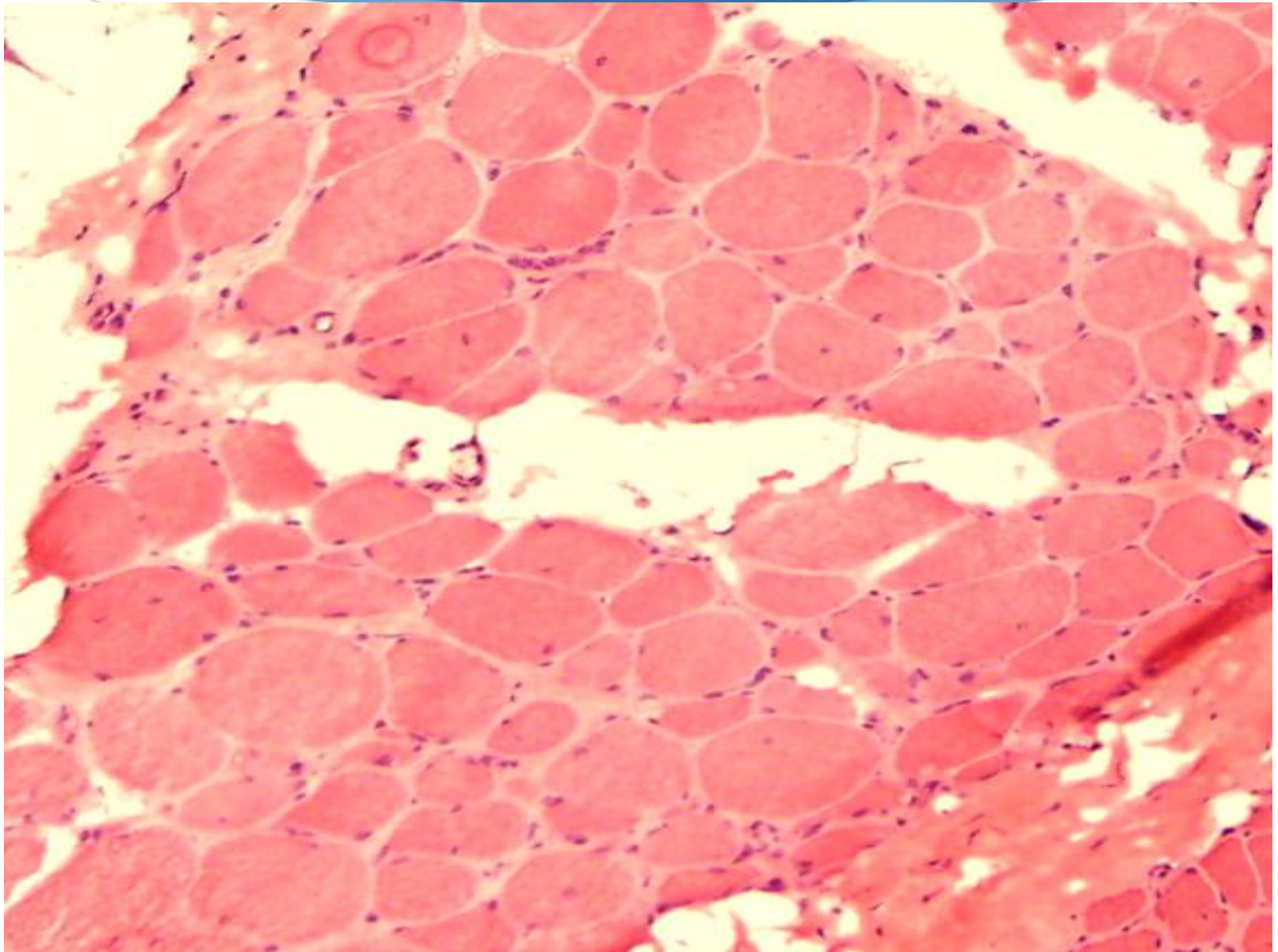
# **Biopsia Muscular en DMD**

# Alteración arquitectura

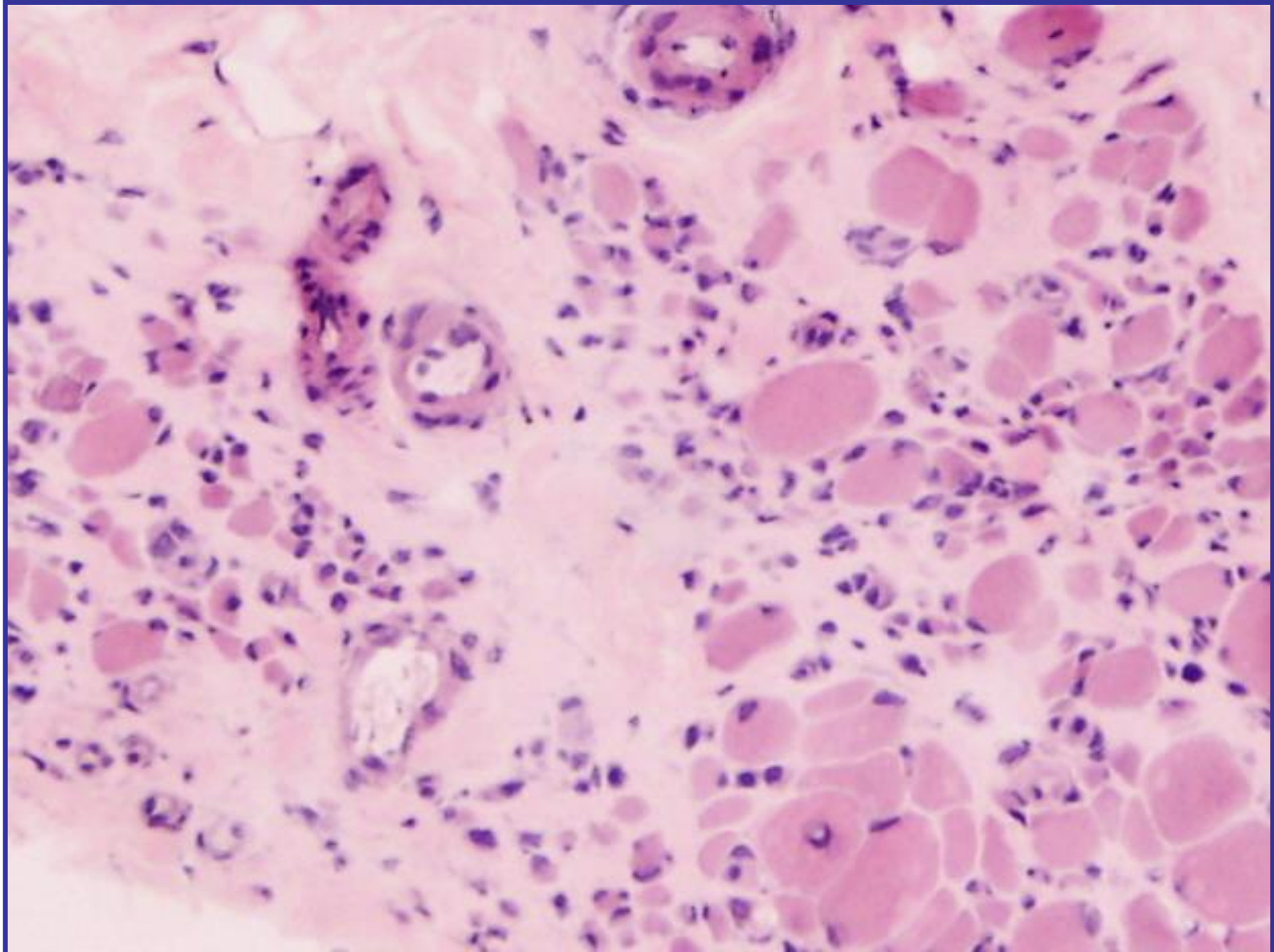




# Alteración arquitectura

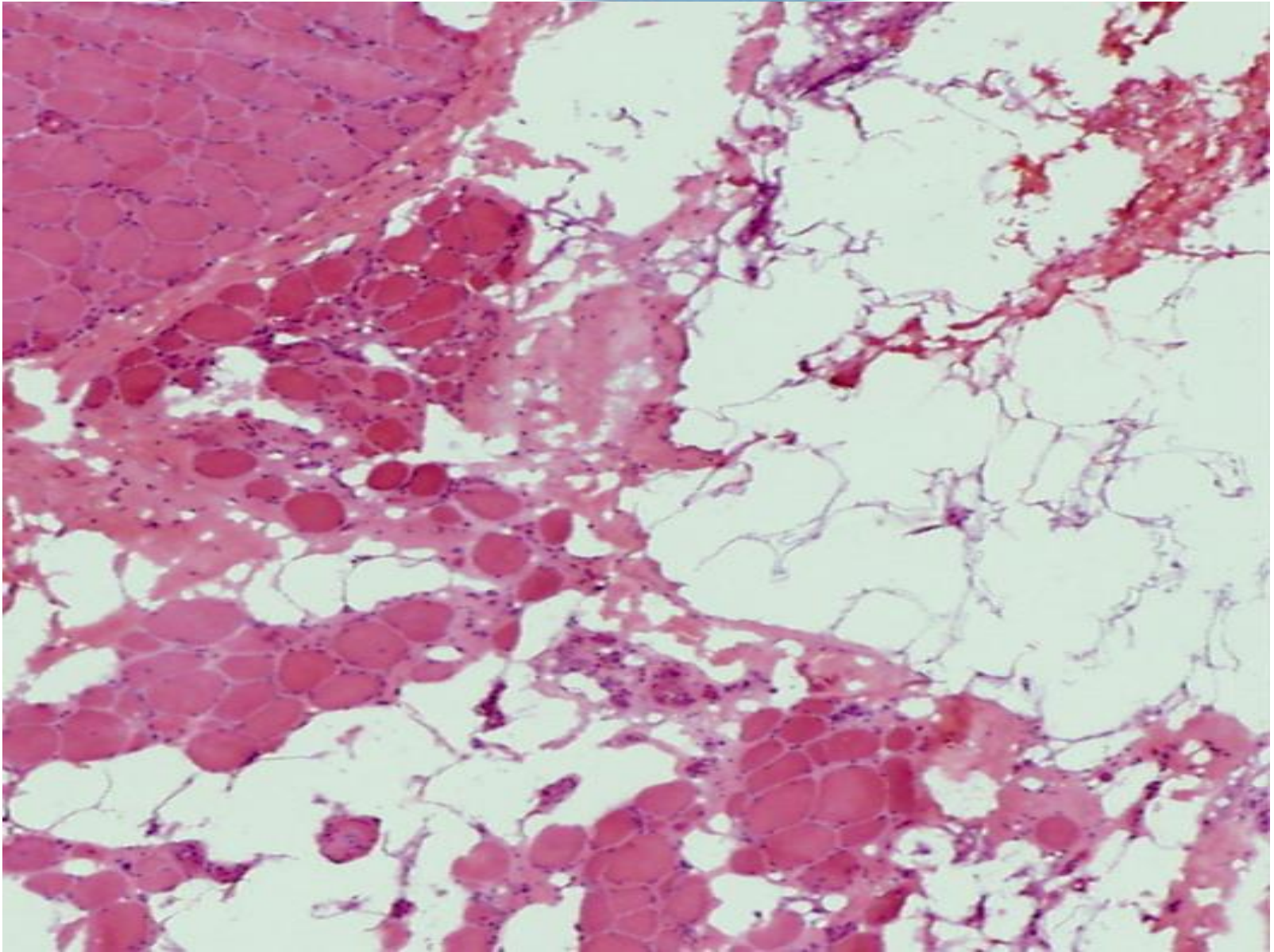


# Alteración arquitectura

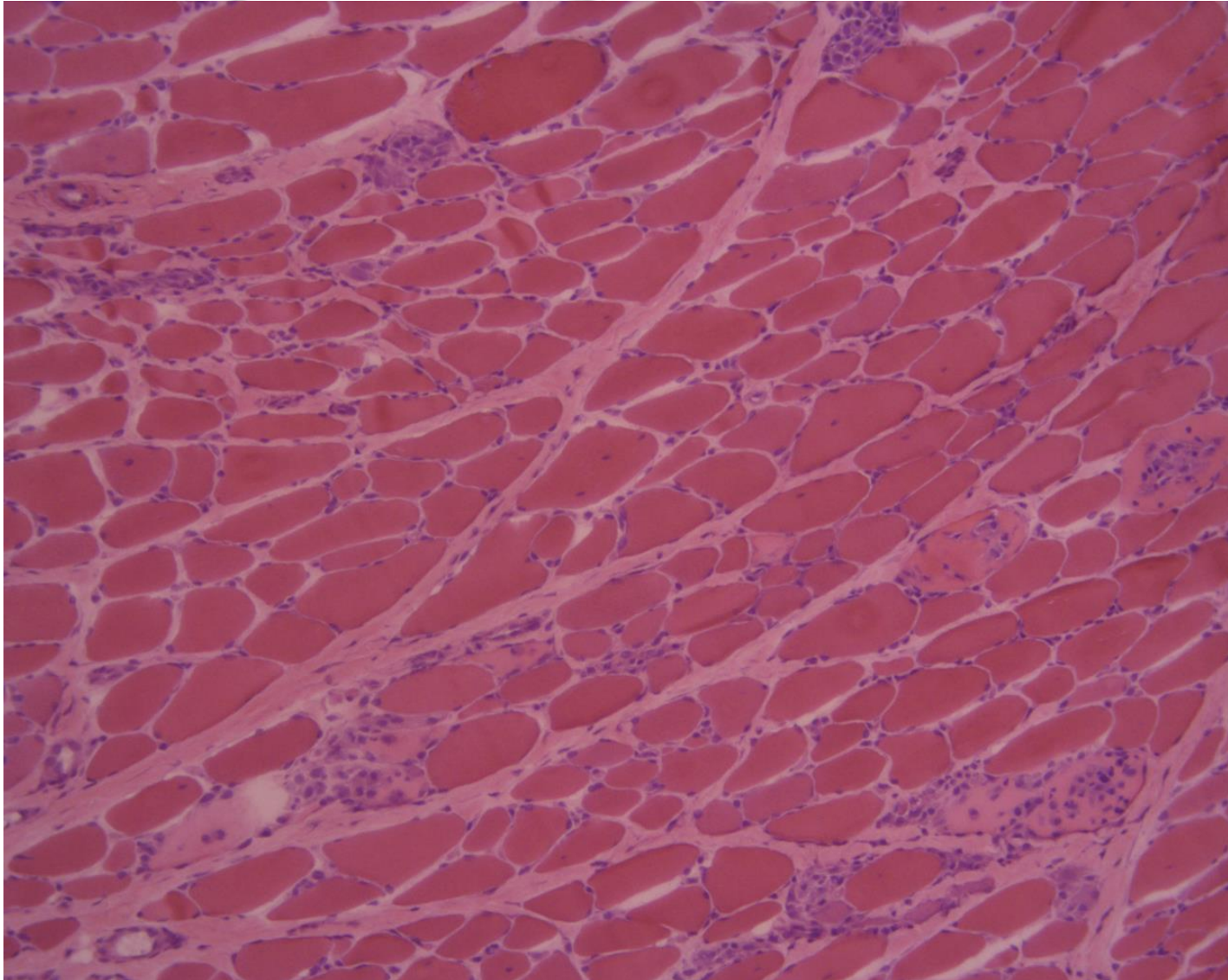




# Alteración arquitectura

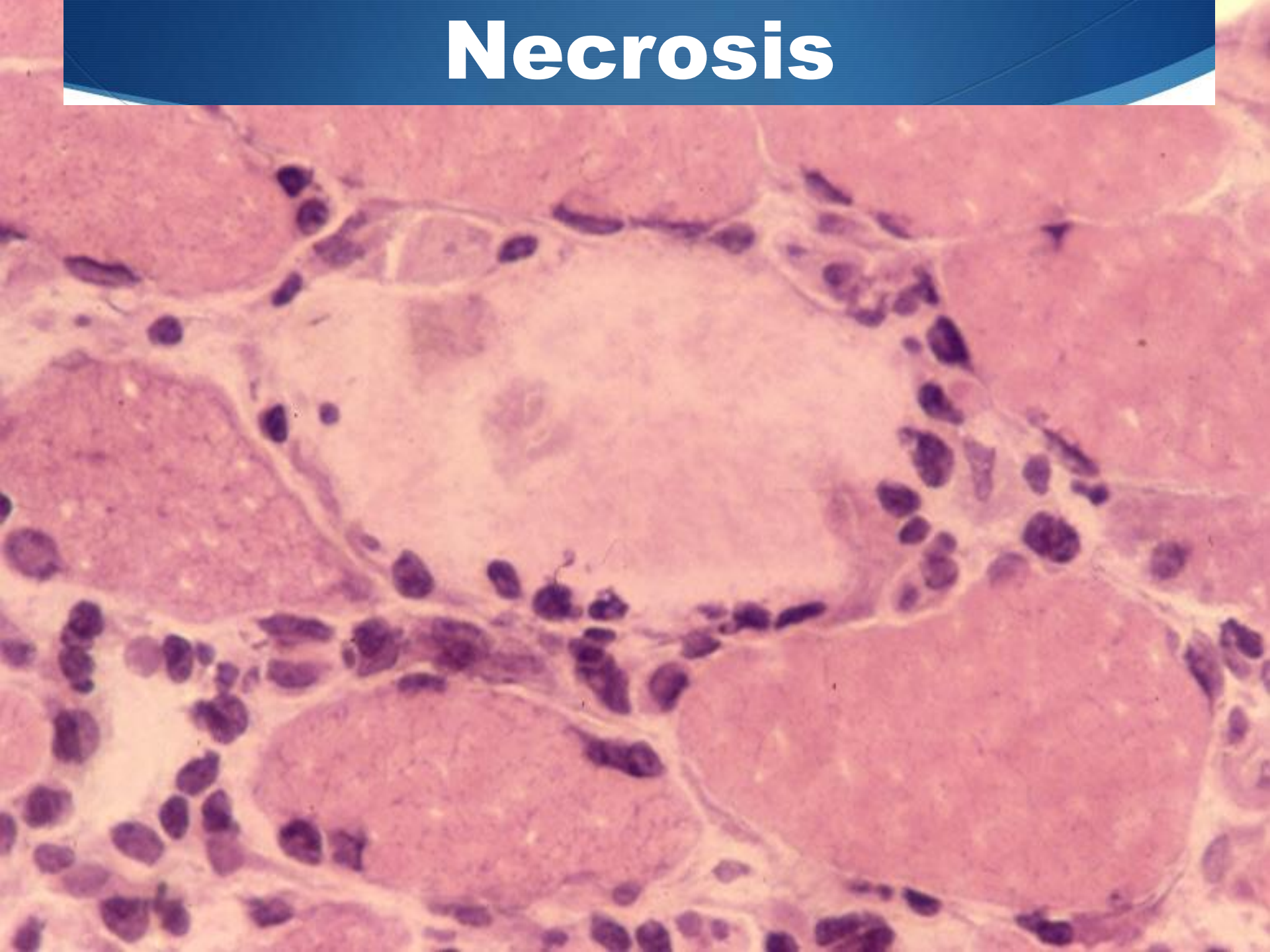


# Necrosis

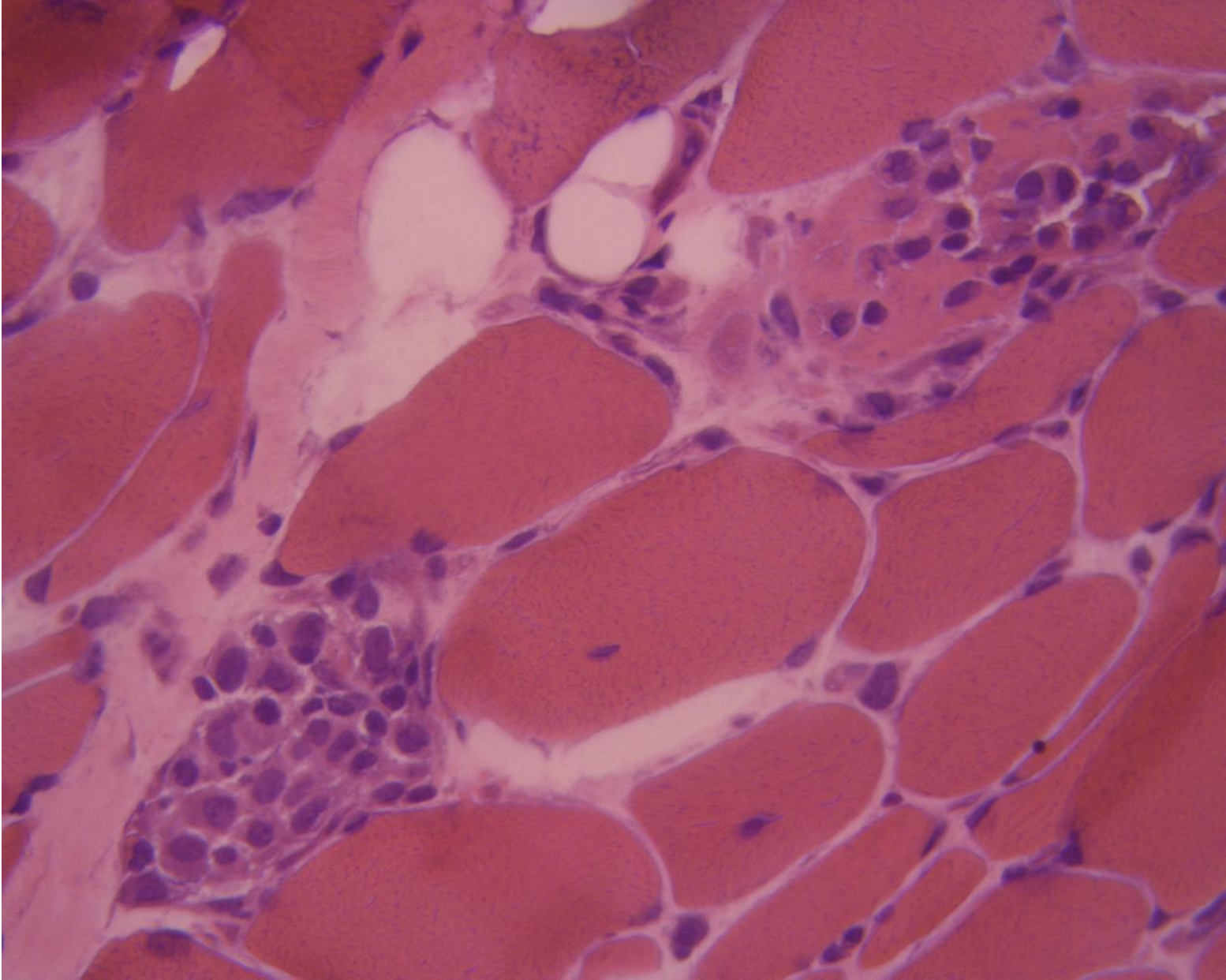




# Necrosis

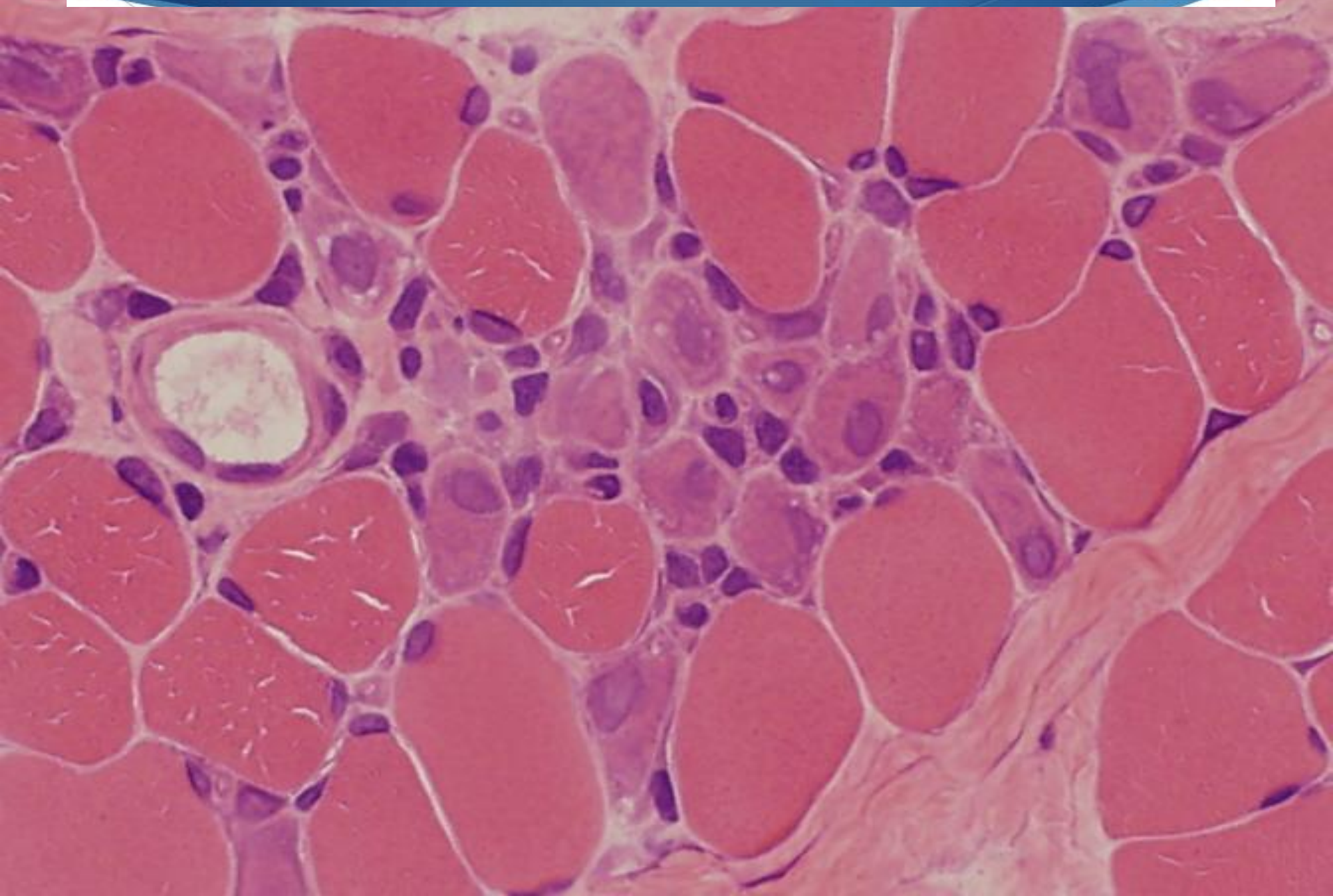


# Necrosis, miofagocitosis

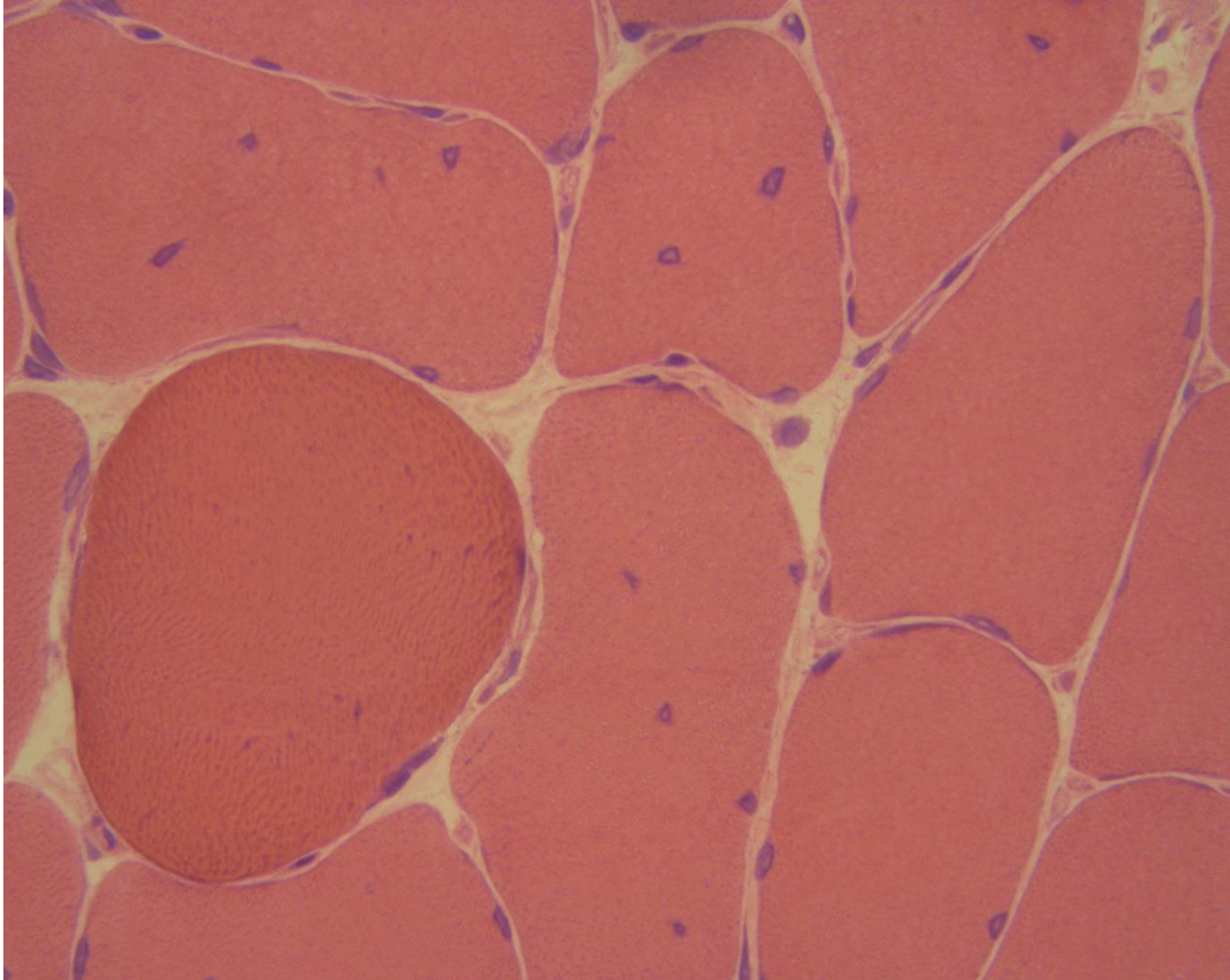




# Regeneración

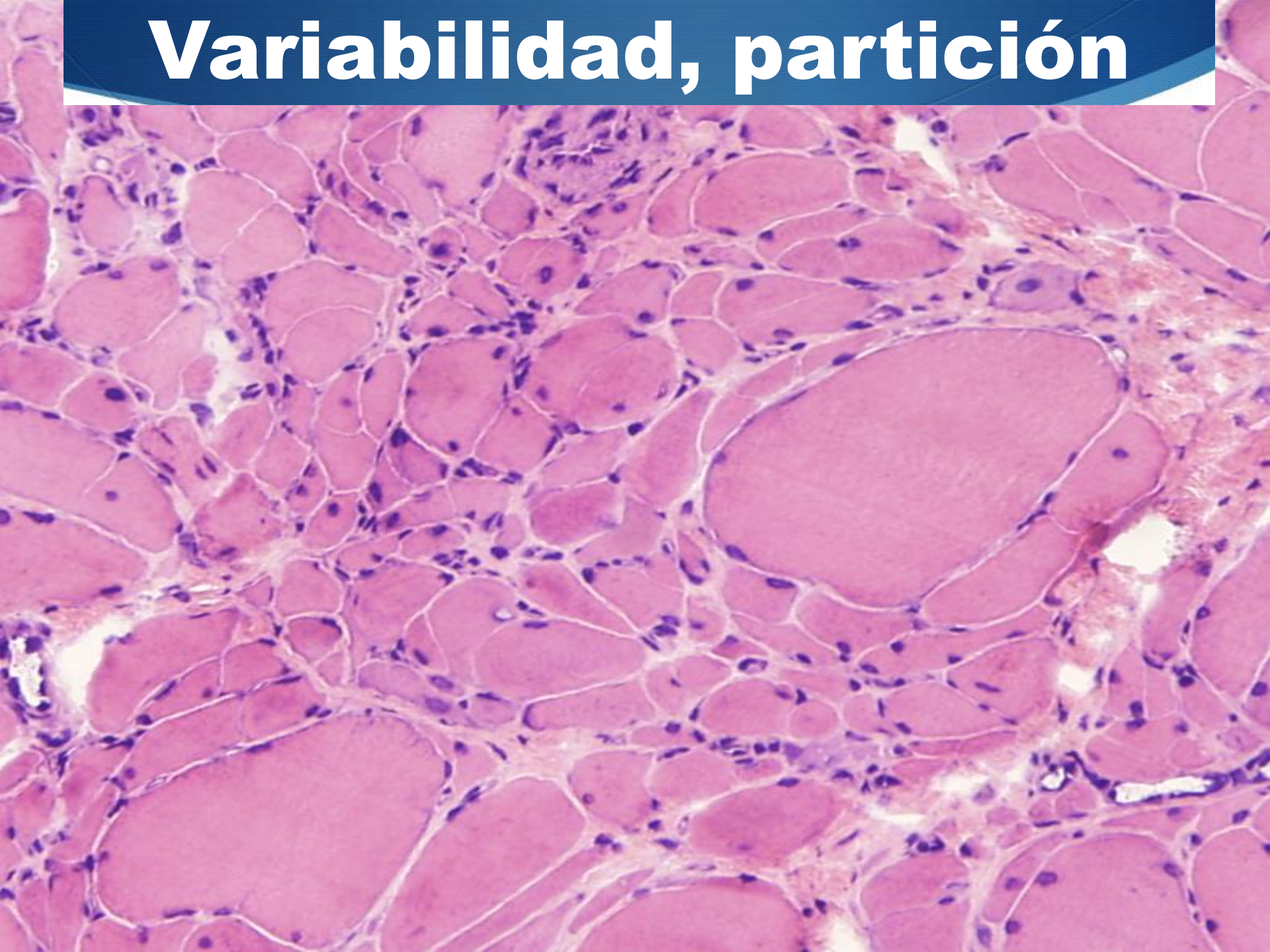


# Fibras Hipercontraidas



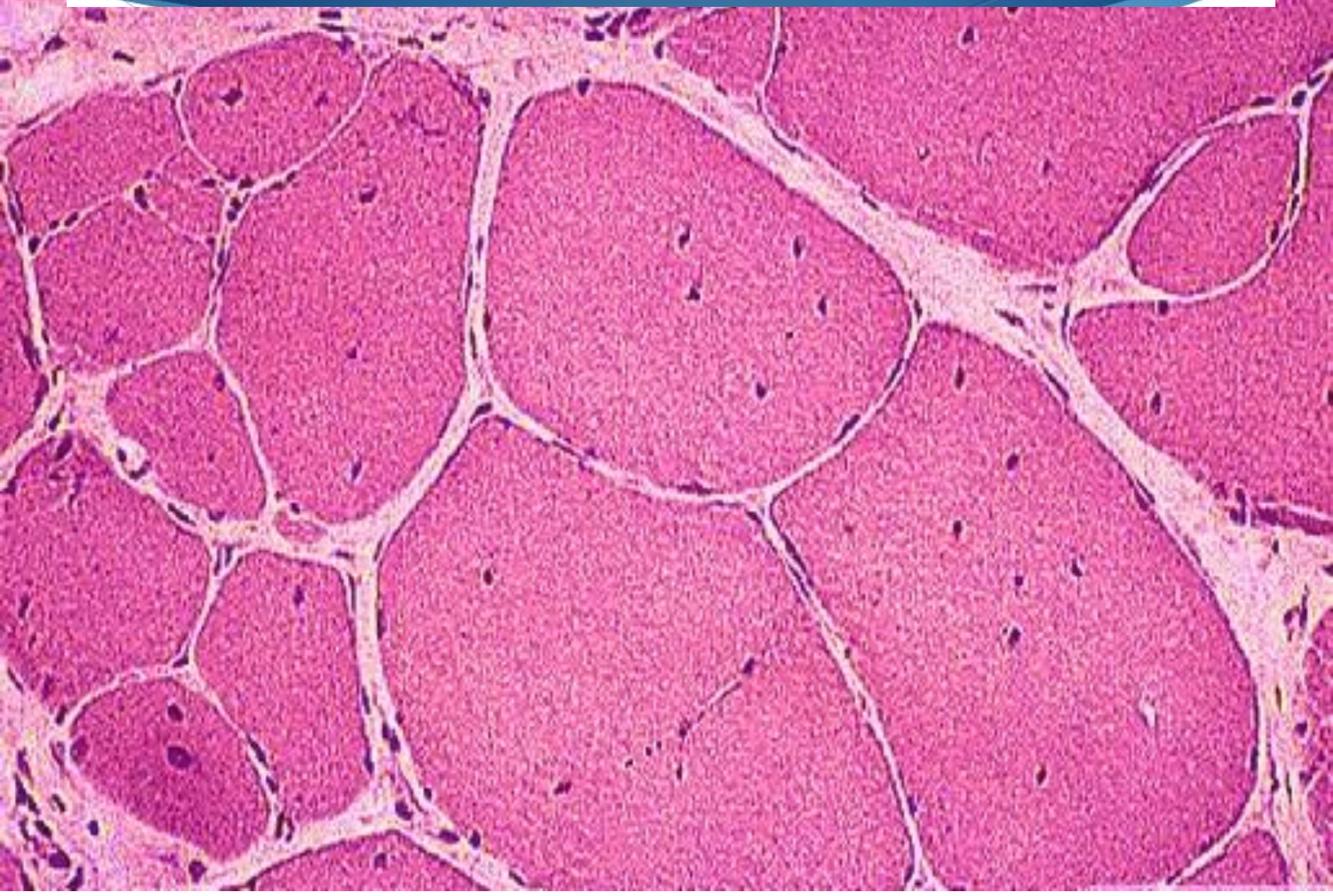


# Variabilidad, partición



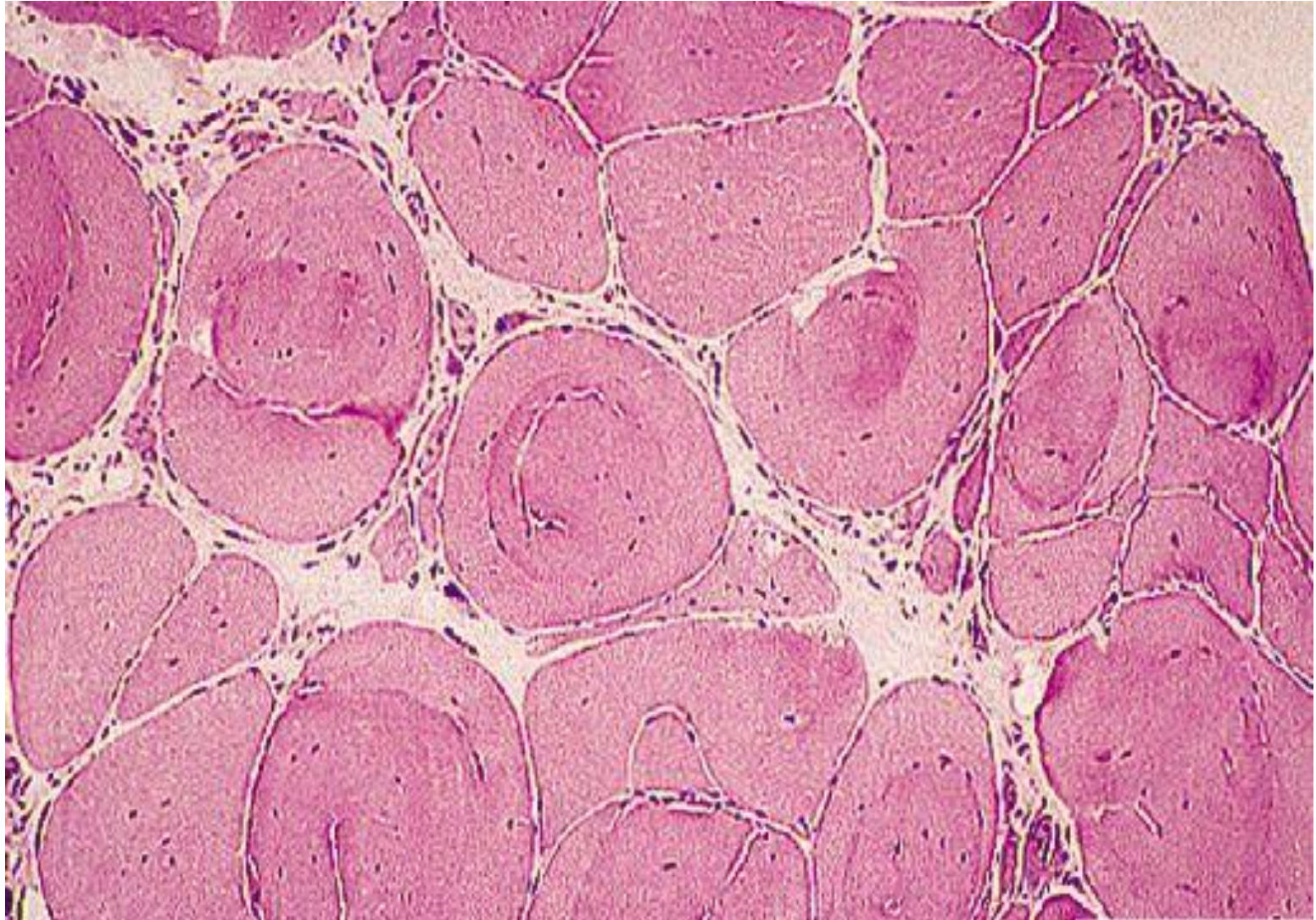


# Internalización nuclear



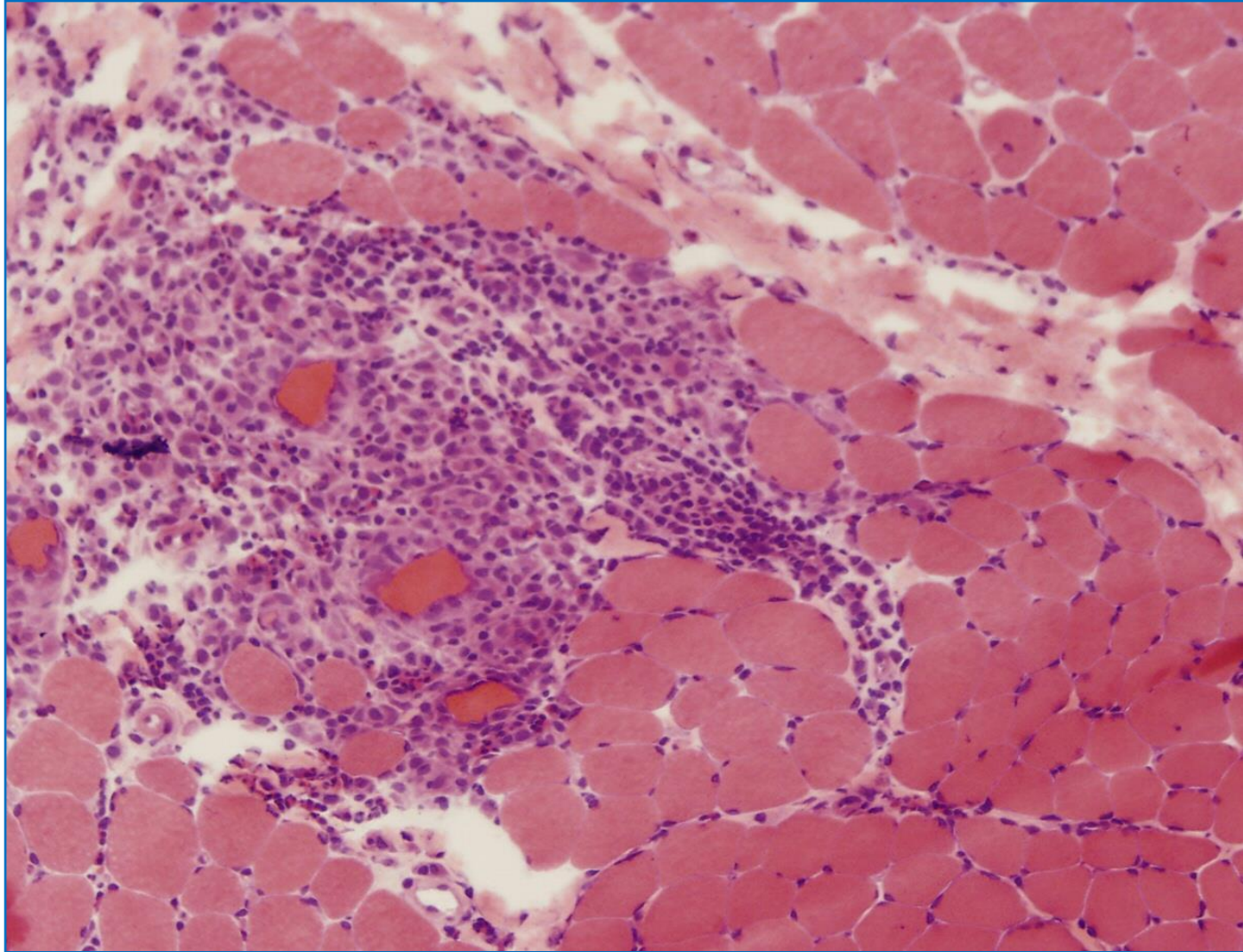


# Alteraciones estructurales





# Inflamación





# Factor Edad

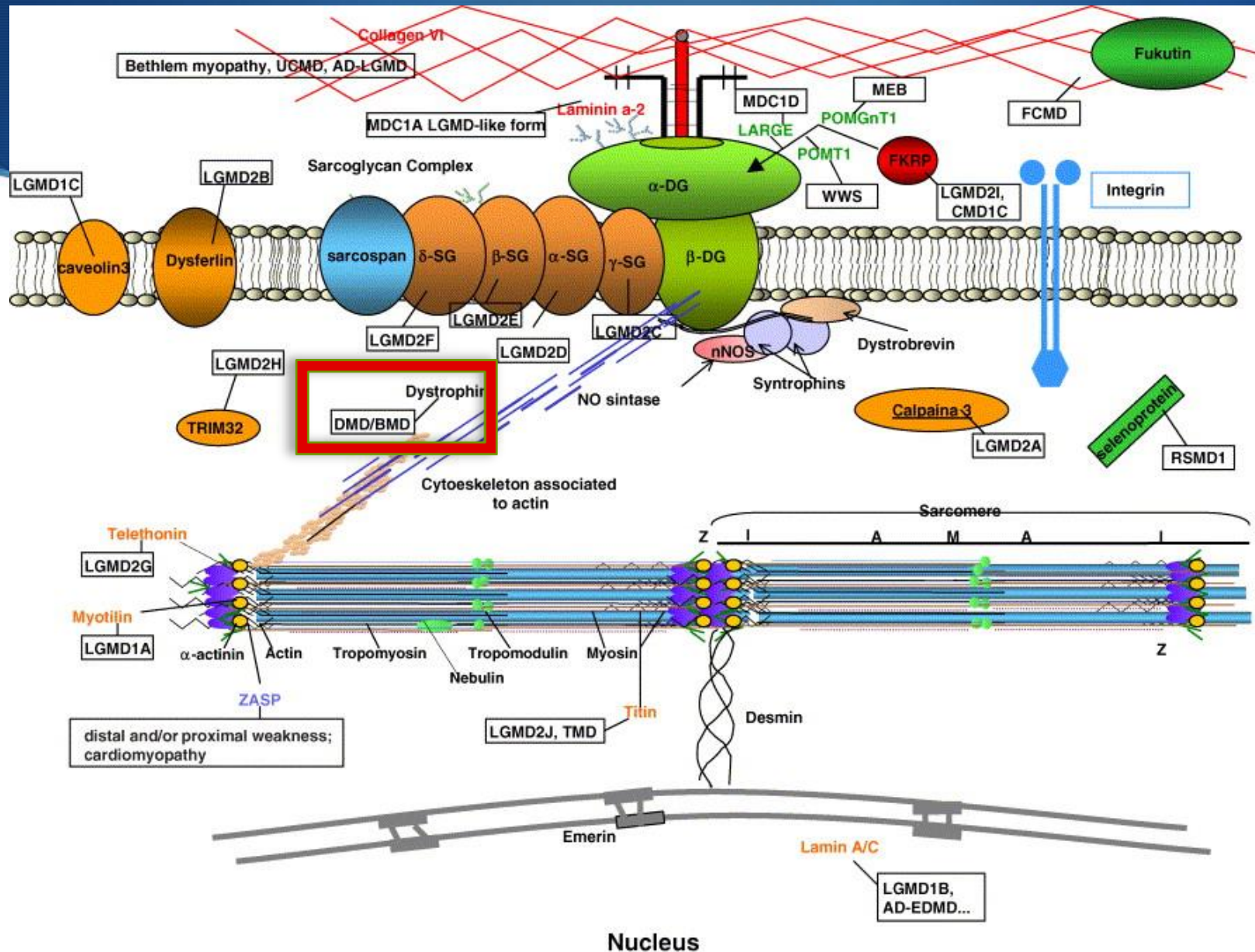
- ◆ Existen cambios patológicos en la DMD, incluso a unos pocos meses de edad (incluso sin clínica, solo CPK).
- ◆ También en DMB alteración incluso en el 1er. año de edad.

# Severidad clínica

- ◆ NO clara correlación severidad clínica con por el grado de patología (sin incluir inmunohistoquímica).
- ◆ No es posible distinguir Duchenne y Becker distrofia sobre la base de la morfología sola.



# Distrofias musculares



# Proteínas de membrana Inmunohistoquímica

## **Distrofinopatías:**

- ◆ Distrofina (3 anticuerpos)

## **Distrofias de Cinturas**

- ◆ Caveolina
- ◆ Sarcoglicanos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,
- ◆ Disferlina
- ◆ Calpaína (WB)

## **Distrofia muscular congénita**

- ◆ Merosina
- ◆ Colágeno VI
- ◆ Alfa-distroglicano

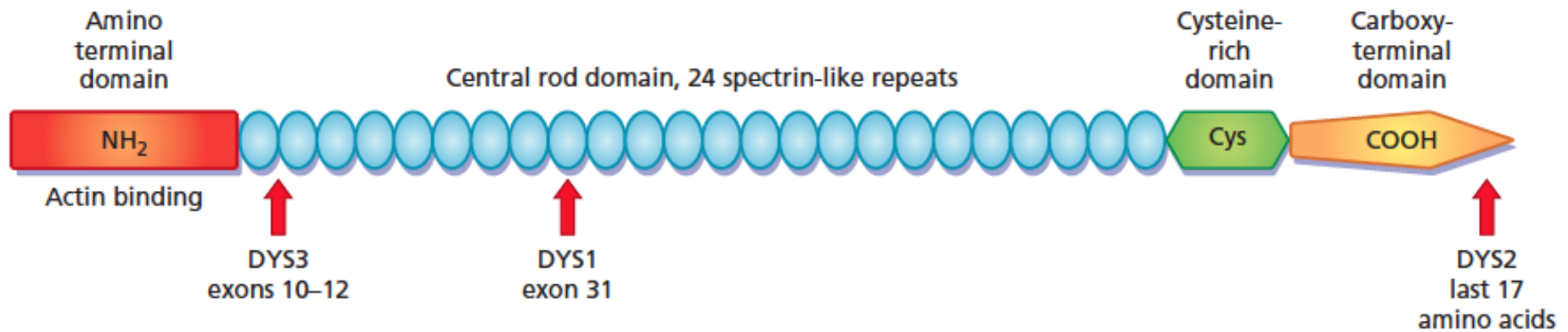
## **Enf Emery-Dreifuss:**

- ◆ Emerina

**M. Miofibrilares:** Desmina, Miotilina



# Inmunohistoquímica Distrofina



**FIGURE 10.10** ■ Diagrammatic representation of the dystrophin gene showing the four main domains and the position of the epitopes of the Leica/Novocastra DYS1, DYS2 and DYS3 antibodies.

# Inmunohistoquímica Distrofina

- ◆ En la práctica, es común el uso de anticuerpos para un N-terminal, rod y el dominio C-terminal.
- ◆ Anticuerpos exón-específicos pueden ser útiles en la identificación de la región de una pequeña deleción.
- ◆ Un papel importante de IHQ se muestra en los casos de DMD, la ausencia de la proteína es fácil de detectar por inmunohistoquímica cuando el diagnóstico no se ha detectado por técnicas moleculares estándar.



# Proteínas de membrana

## Inmunohistoquímica

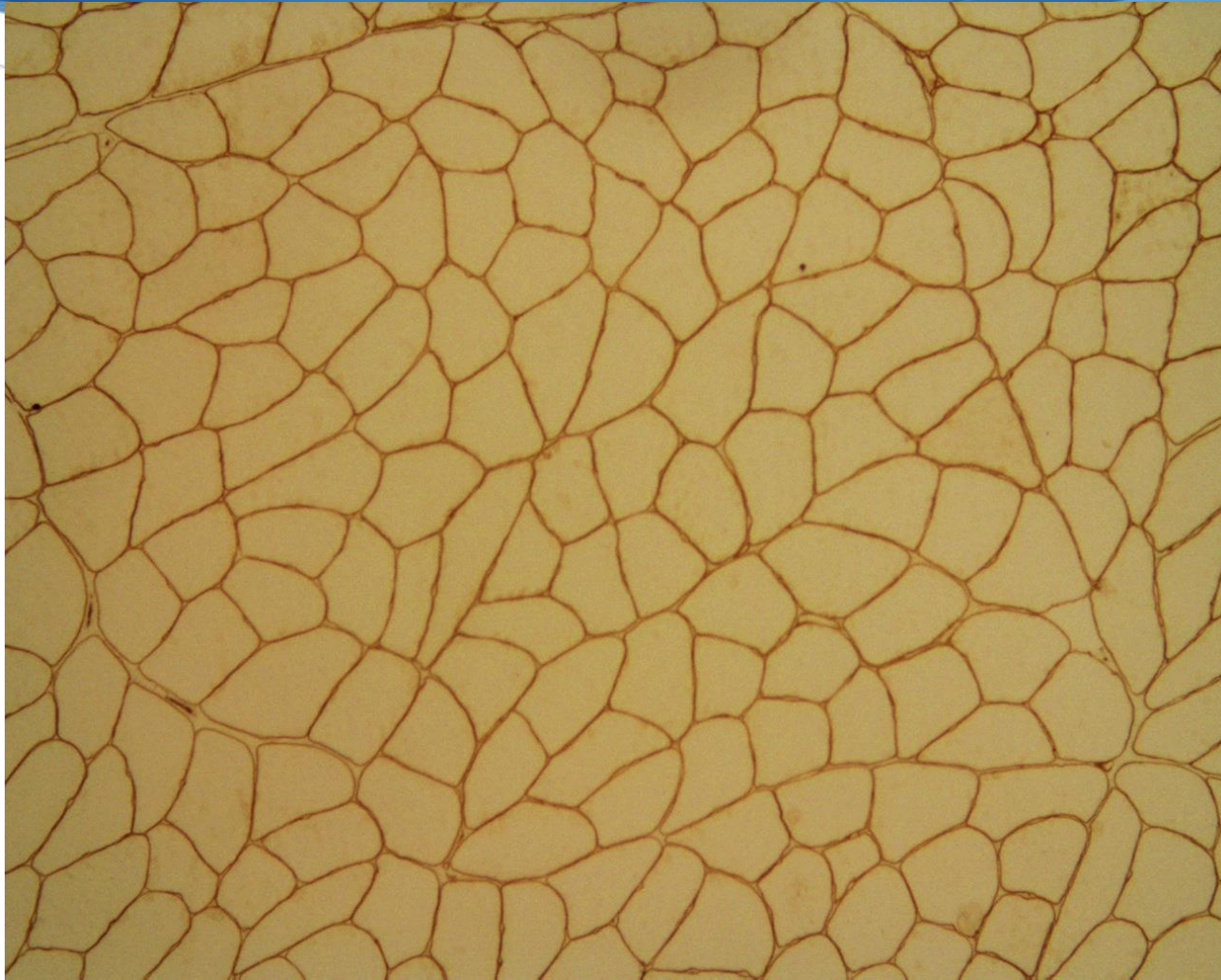


**Distrofina**

**Normal**

# Inmunohistoquímica

## DMD

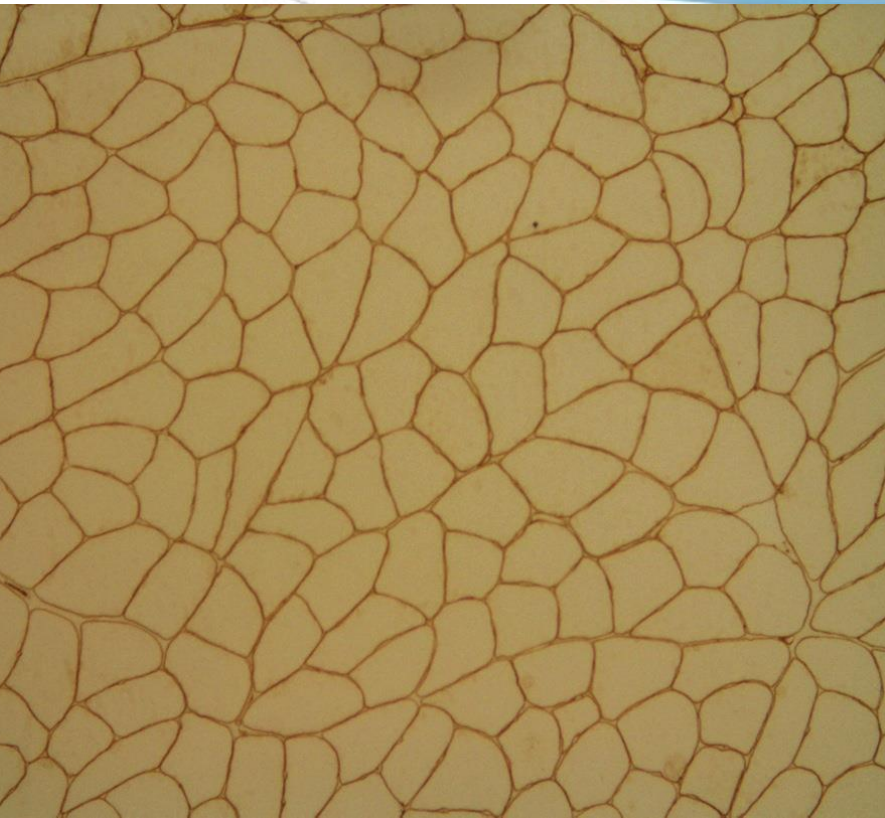


Espectrina  
Control

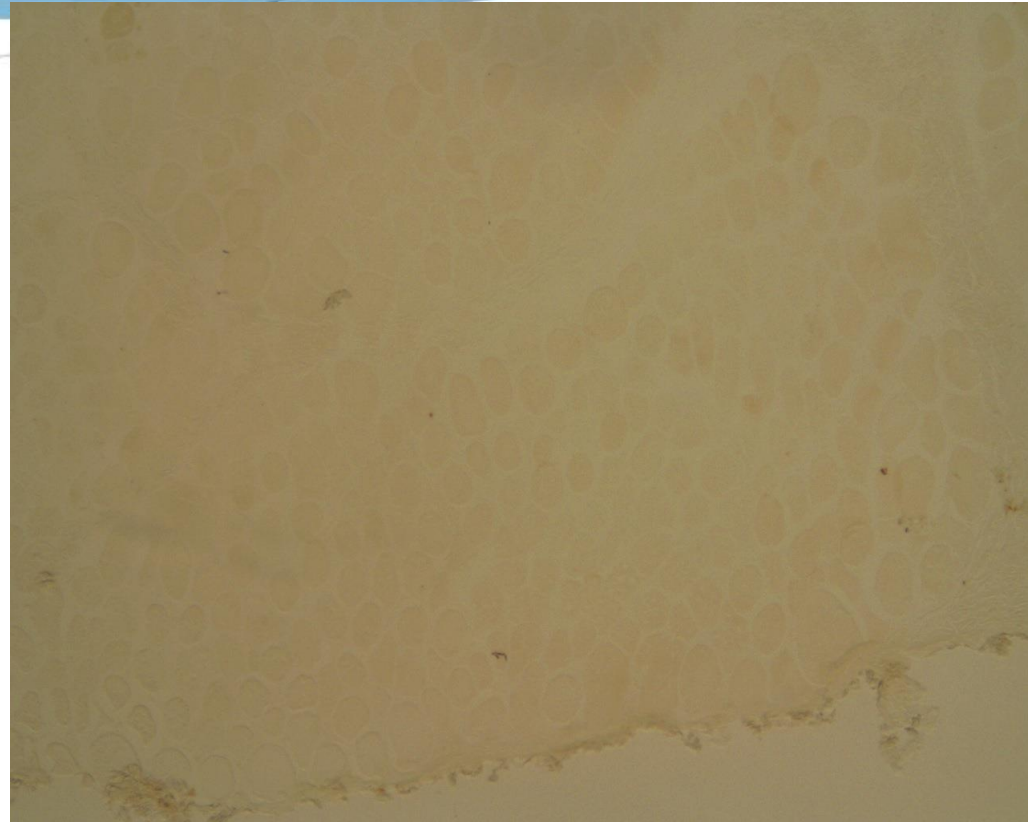


# Inmunohistoquímica

## DMD



Espectrina (control)



Distrofina

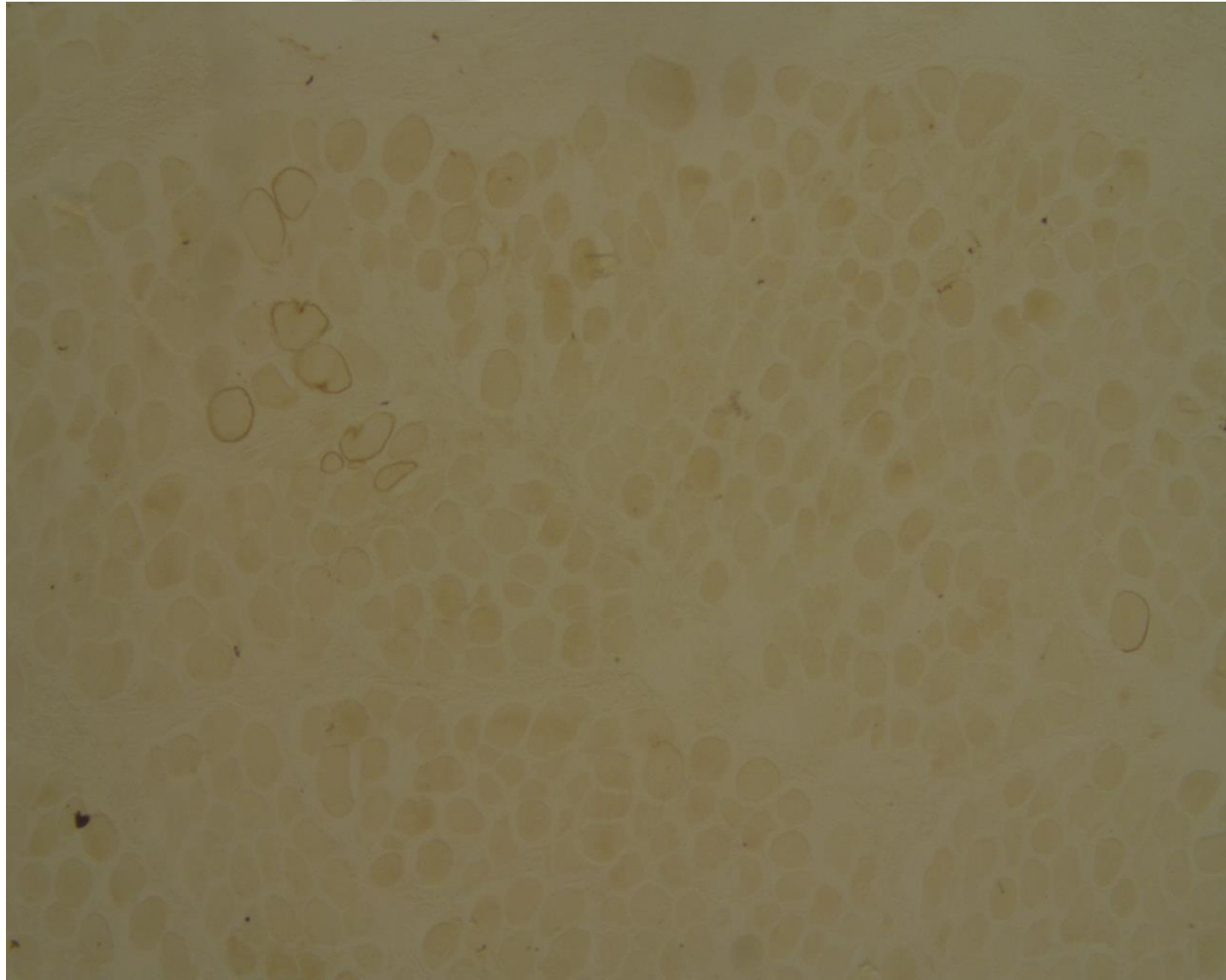
# Inmunohistoquímica

## DMD

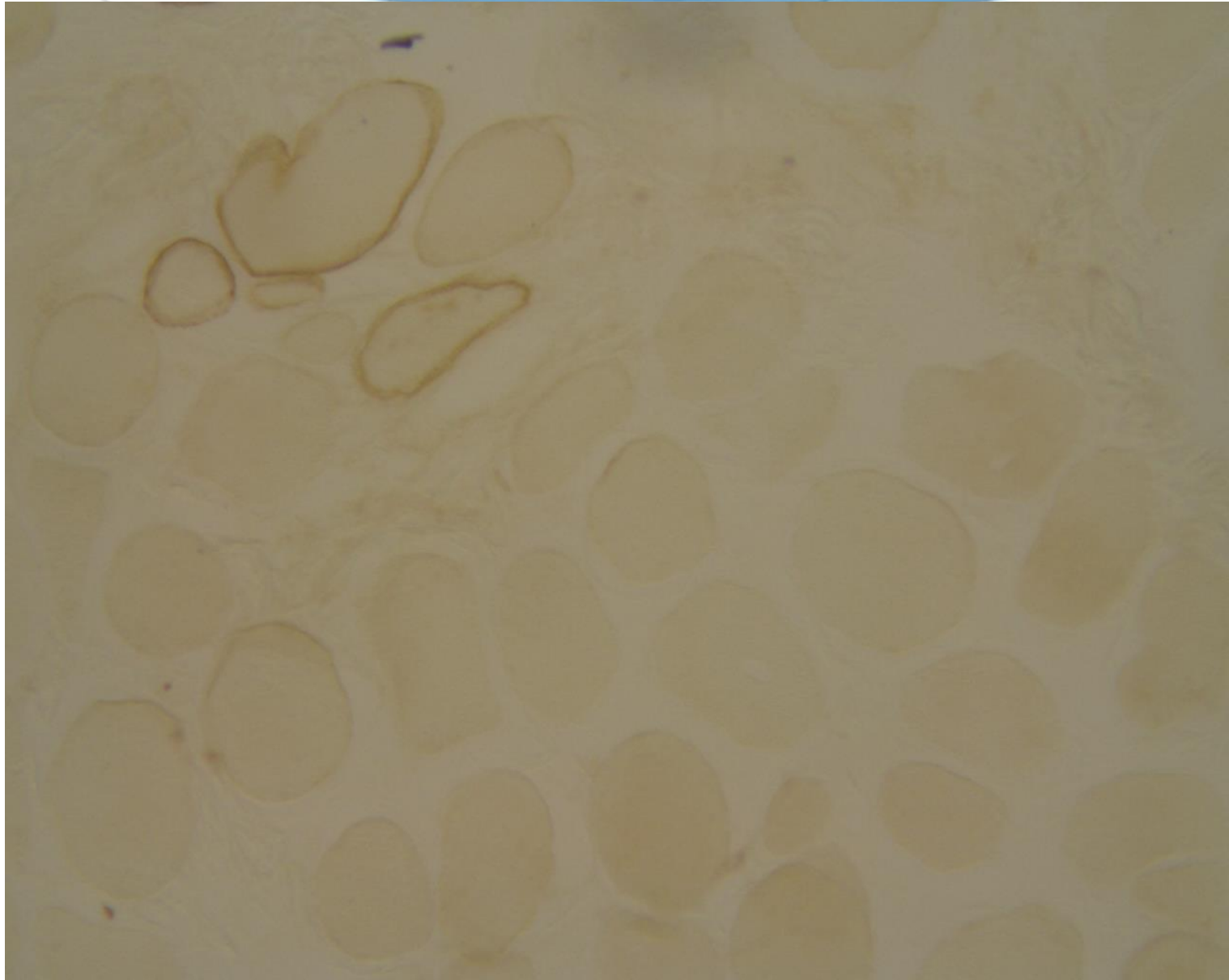
- ◆ En los casos de Duchenne la distrofina no se detecta en la gran mayoría de las fibras (solo en revertidas)
- ◆ En contraste, la mayoría de los casos de Becker muestran una reducción y / o irregularidad en la tinción de las fibras musculares.



# Fibras “revertidas”



# Fibras “revertidas”

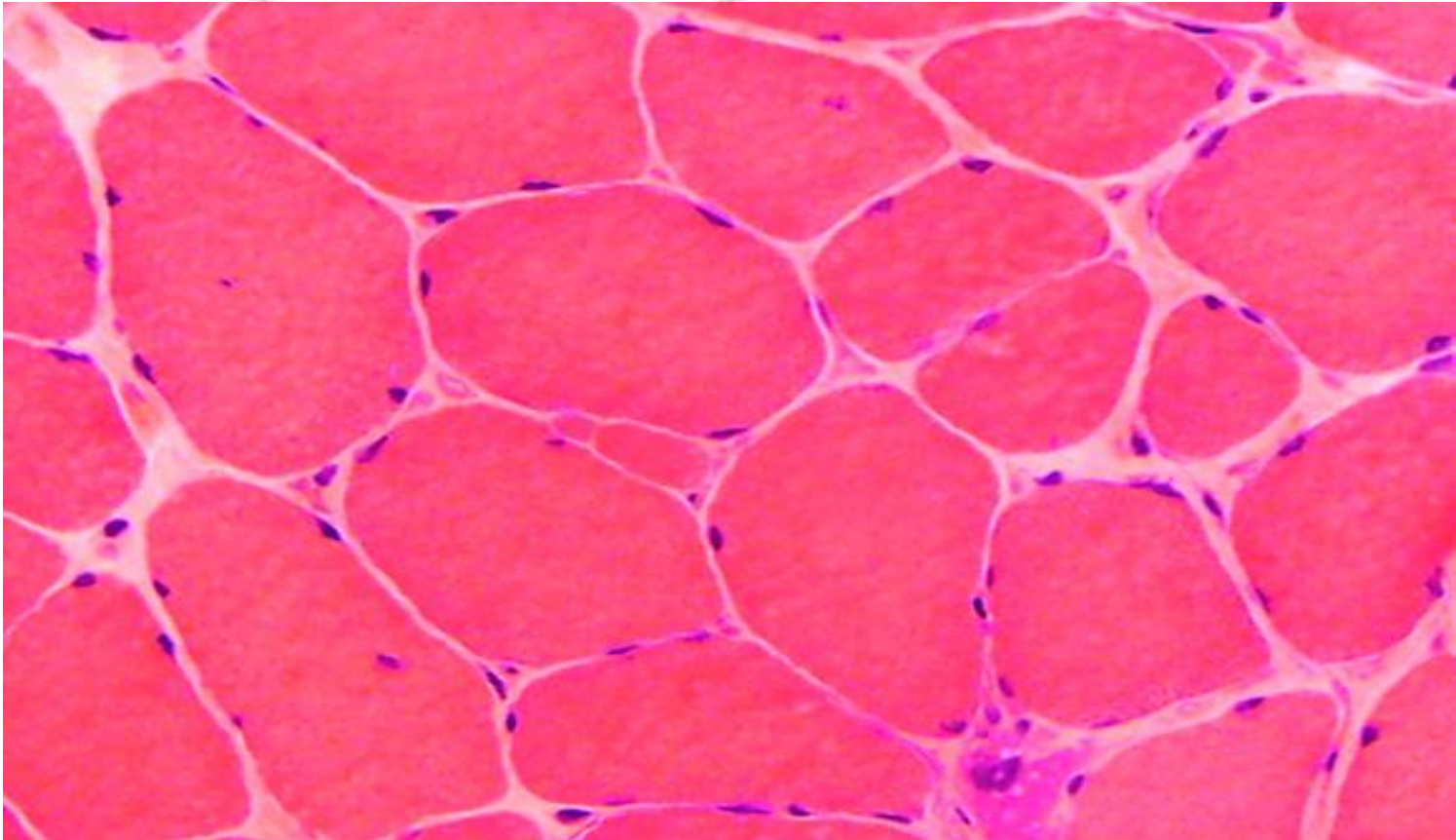




# Fibras “revertidas”

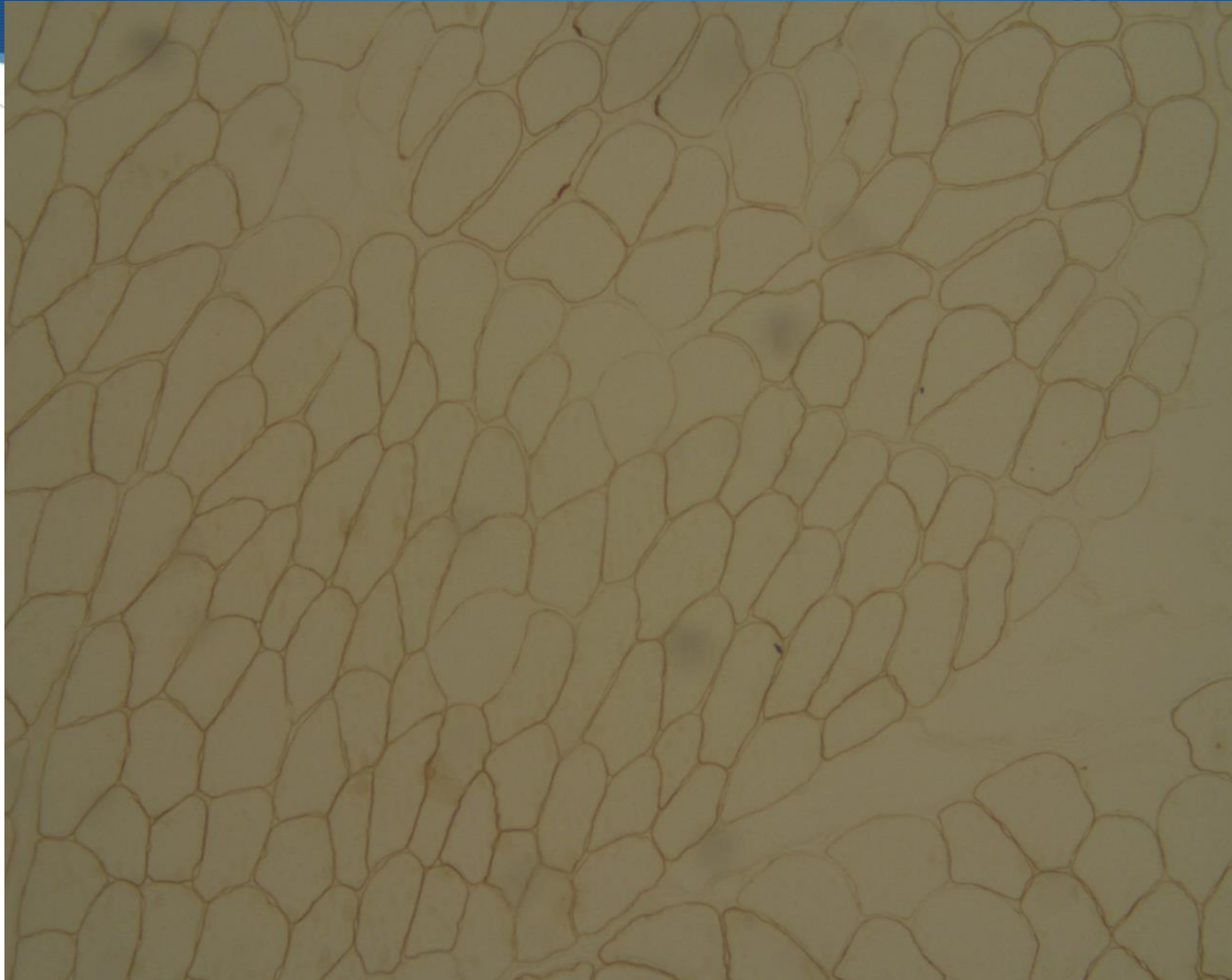
- ◆ Presentes en 50% de pacientes con Duchenne.
- ◆ Estas son las fibras en el que se ha restaurado el marco de lectura, “saltándose” la mutación, por mecanismos de “splicing”
- ◆ El número de fibras “revertant “ en una biopsia es variable (generalmente <math><0,1-7\%</math>).
- ◆ El número no muestra correlación con la severidad clínica.

# **Distrofinopatía leve, enf. Becker**

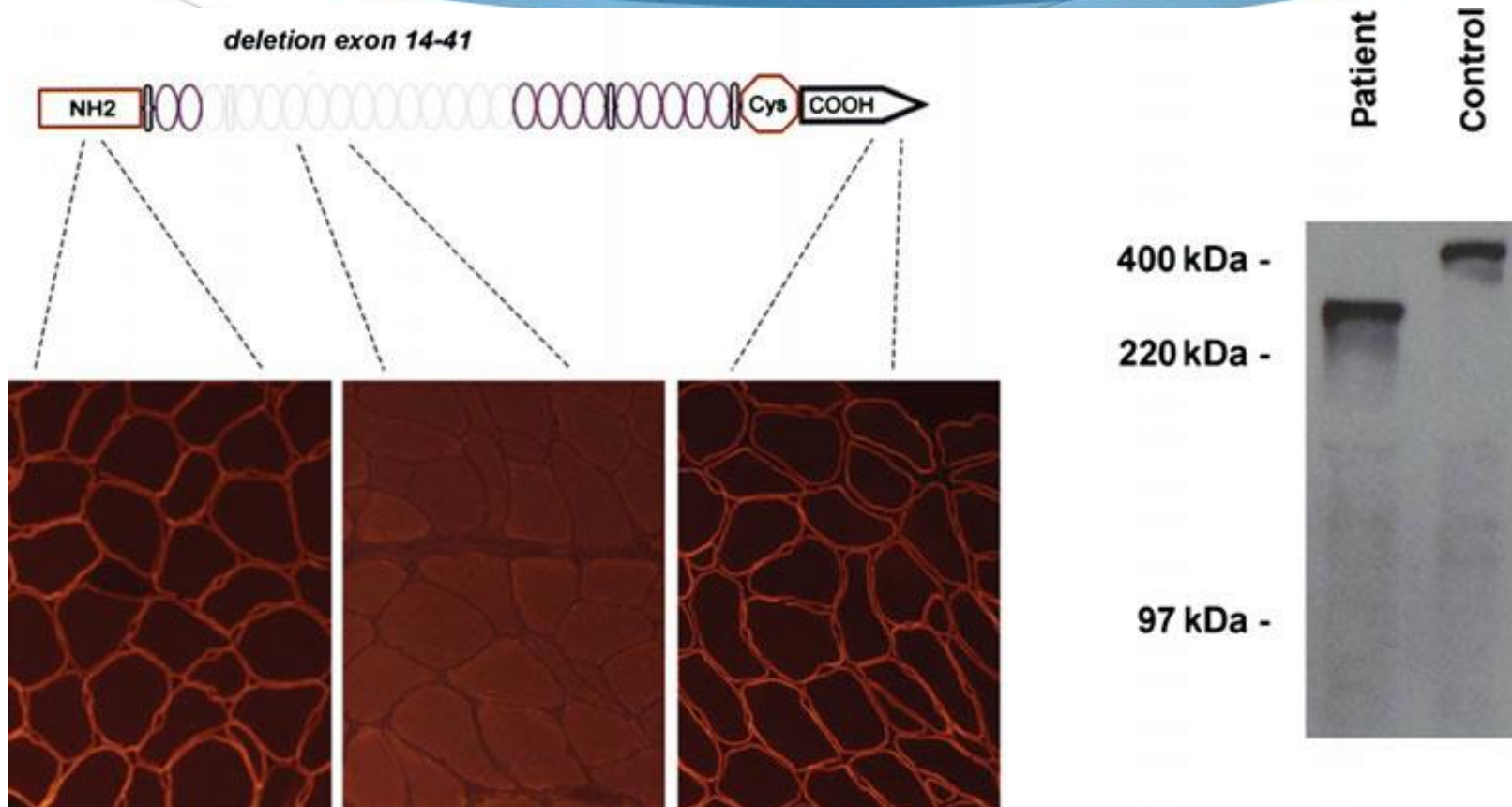




# **Distrofinopatía Becker**



# Distrofinopatía leve, enf. Becker

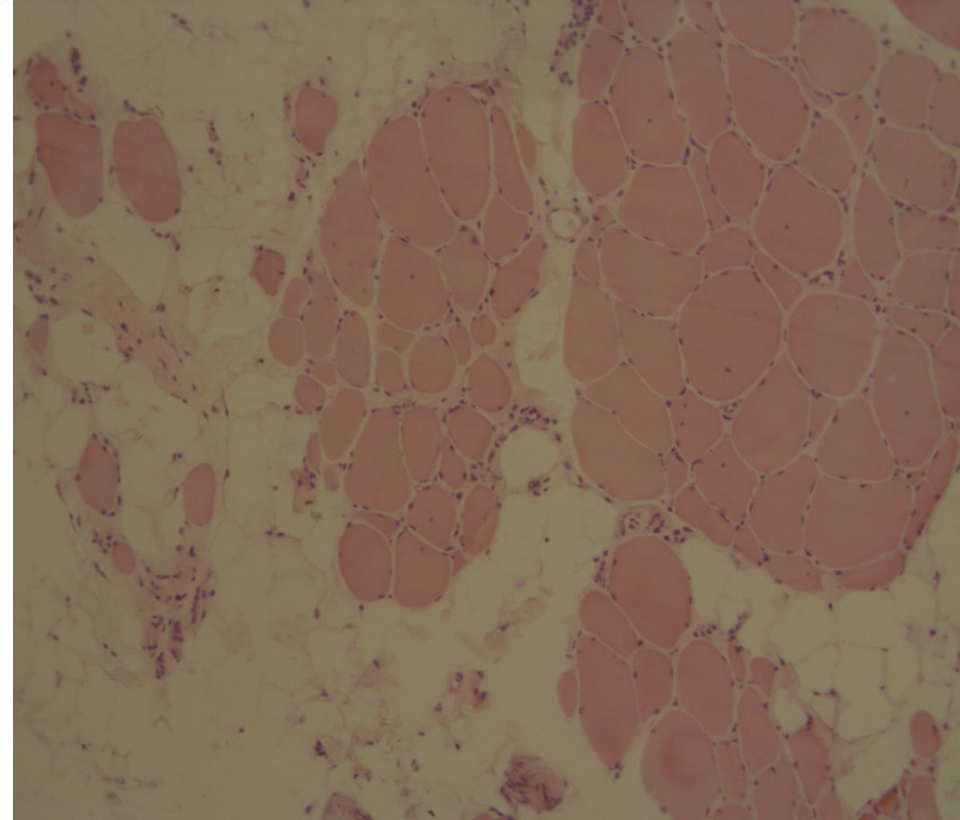
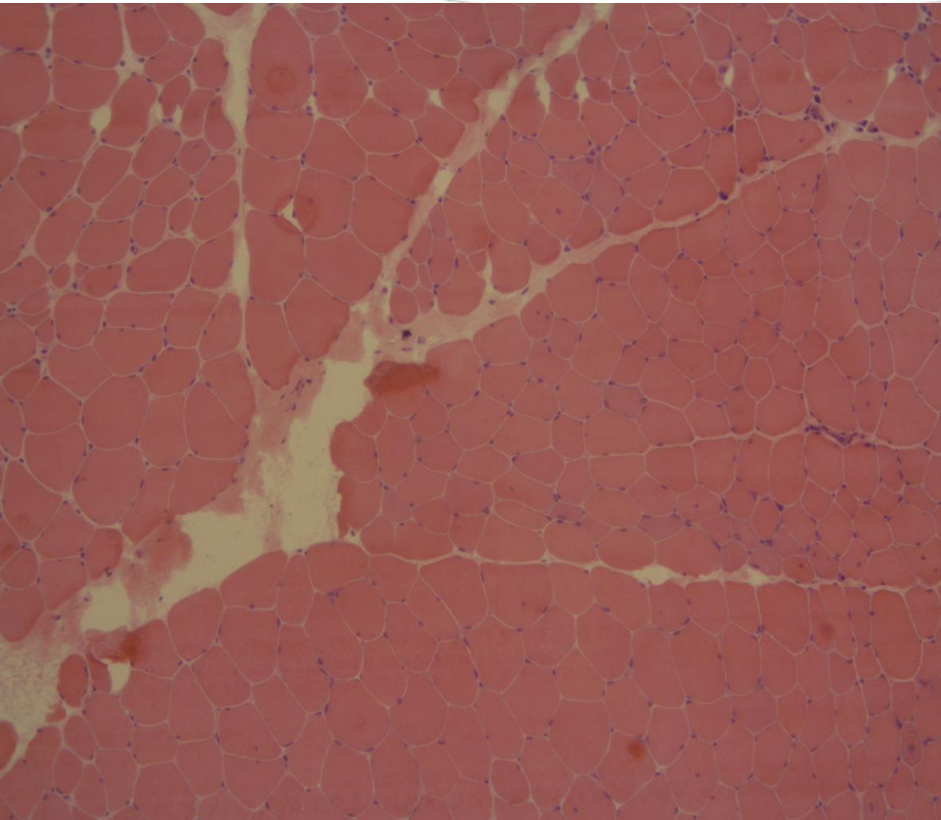




# Inmunohistoquímica Becker

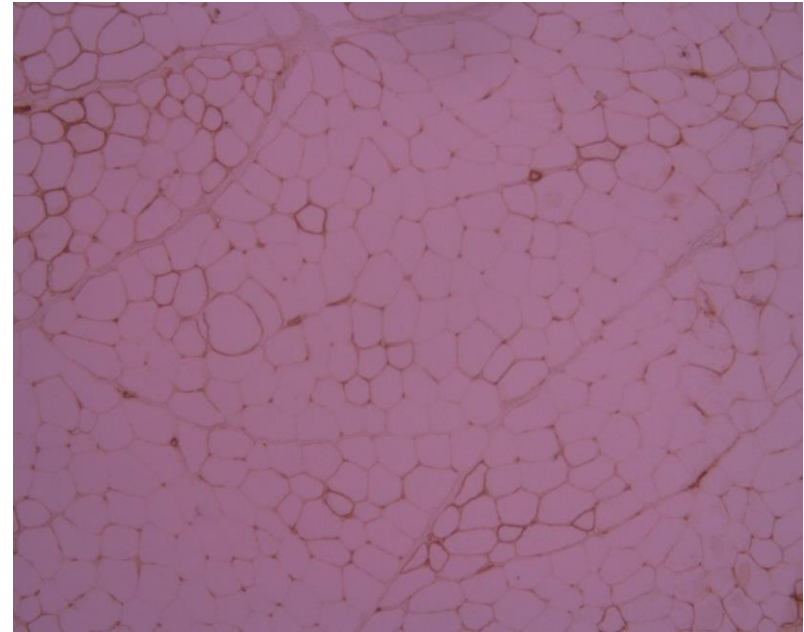
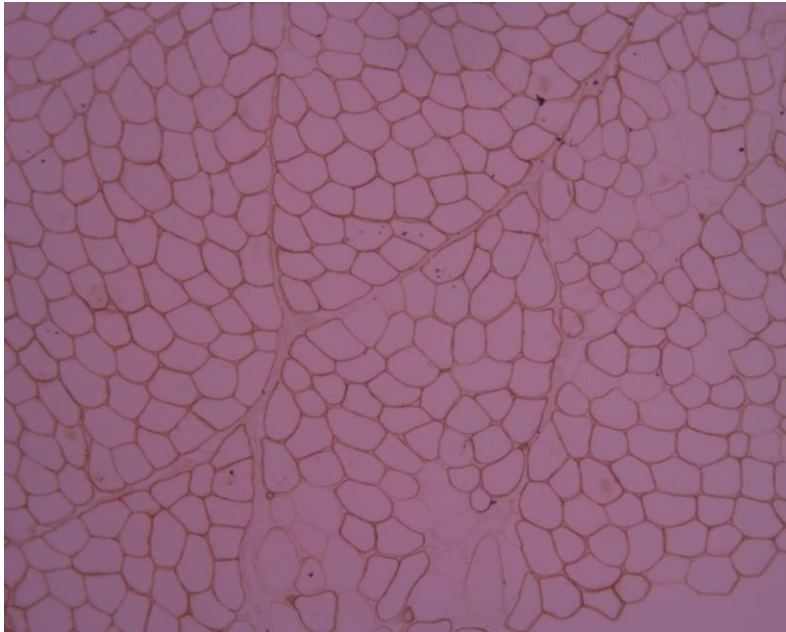
- La mayoría de los casos de Becker muestran una reducción y / o irregularidad en la tinción de las fibras musculares.
- En Becker, dudosa correlación niveles de Distrofina y severidad de clínica.
- Puede existir un efecto umbral, hasta 10% correlación clínica con niveles de distrofina.

# Portadoras Distrofinopatía

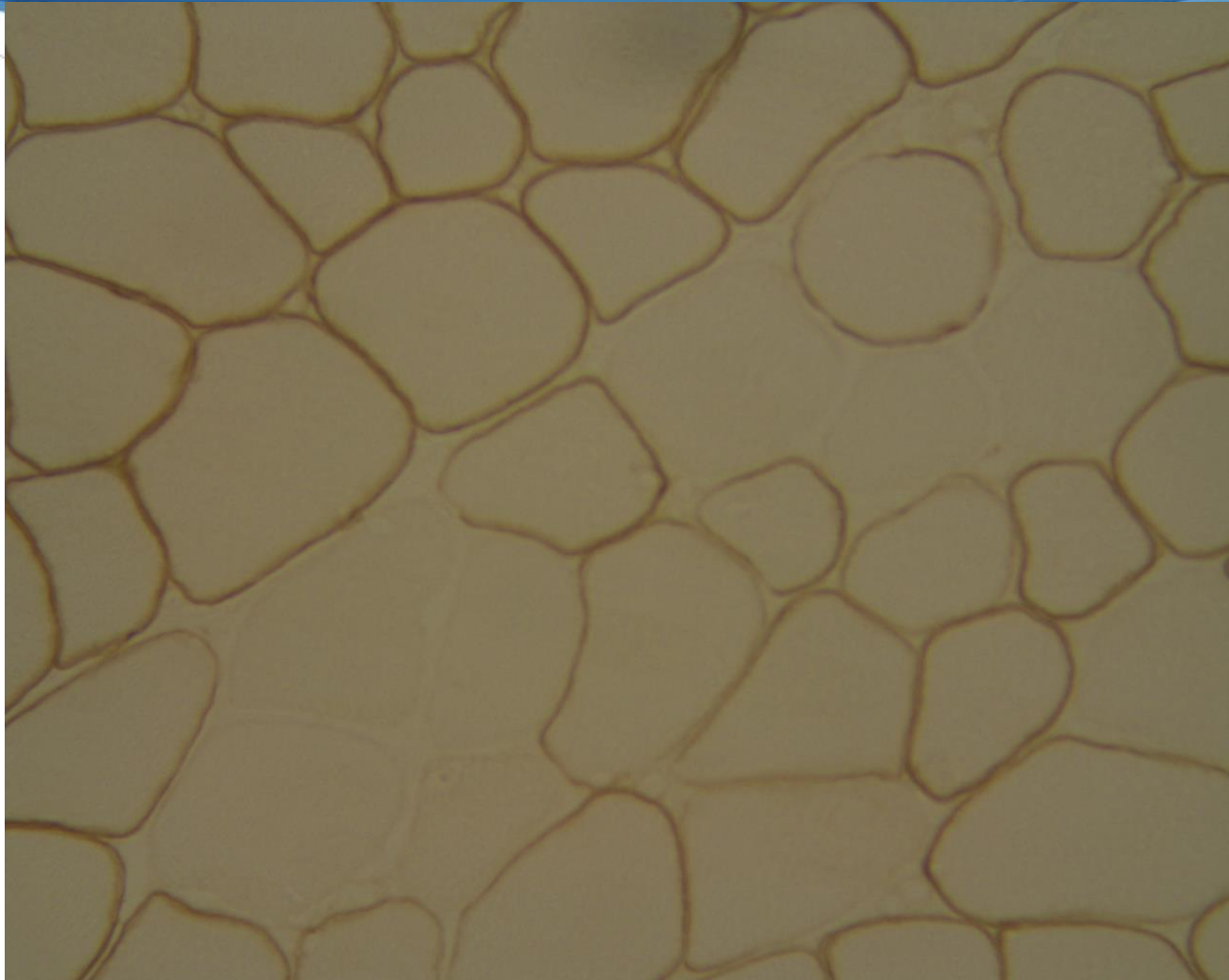




# Distrofinopatía Portadora



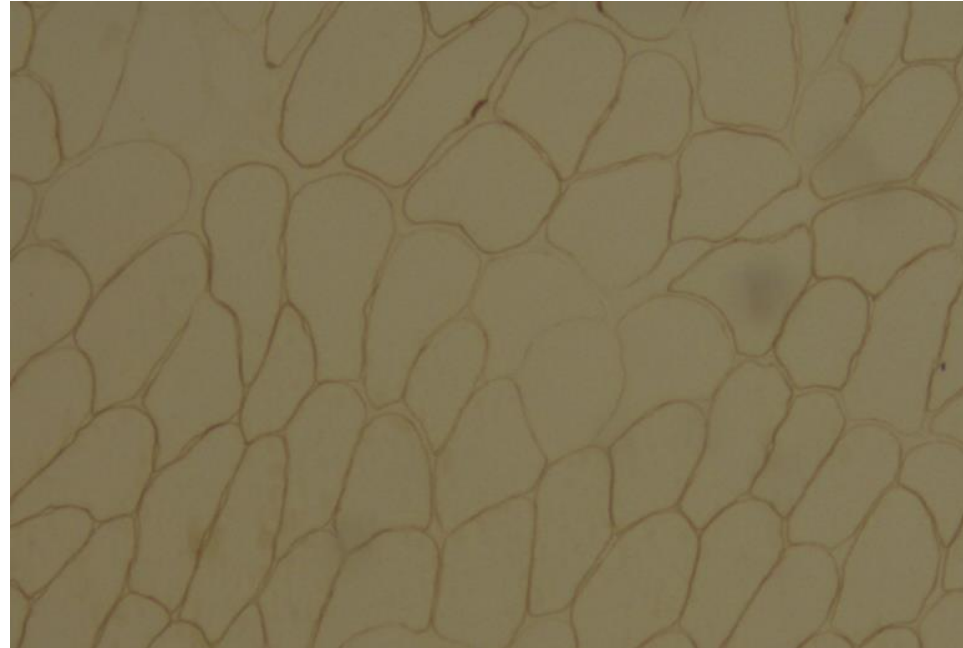
# **Distrofinopatía Portadora**





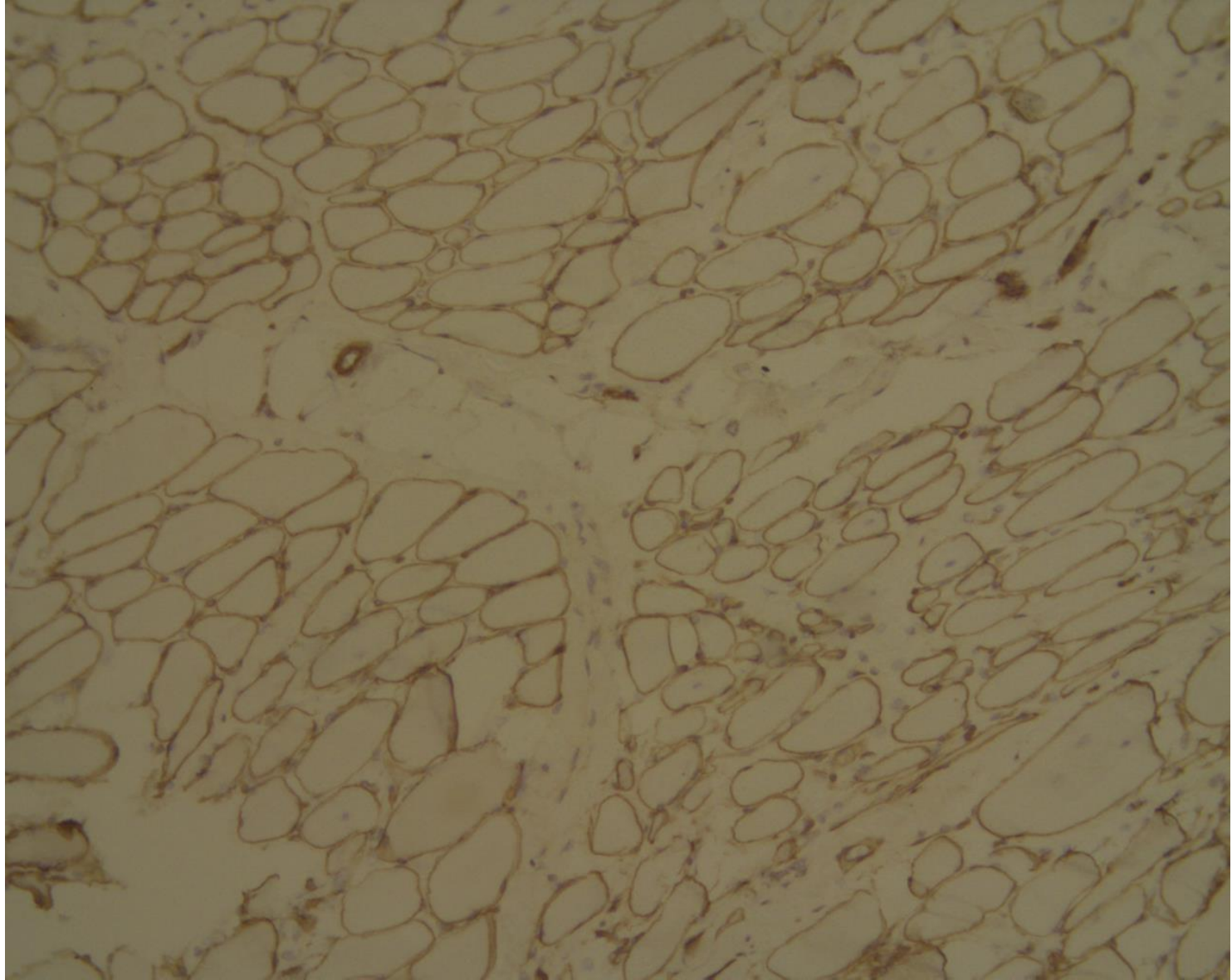
# IHC: alteraciones secundarias

- ◆ Raramente disminución IHQ secundaria en otras distrofias (Fukuyama y alguna DMC)
- ◆ Al revés, si, sobre todo sarcoglicanos.



Sarcoglicanos

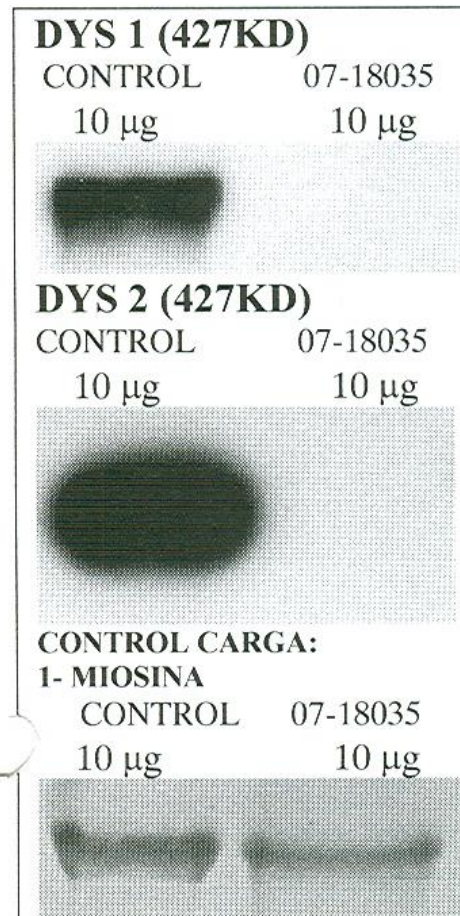
# Sobre-expresión Utrofina





# Estudio de Distrofina por Western Blot

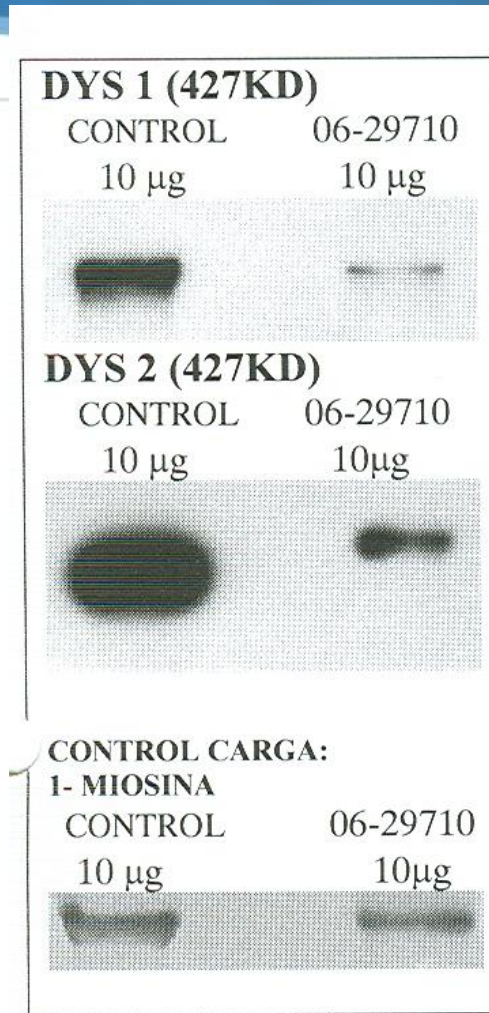
- Variaciones en el tamaño y cuantificación



DMD

# Estudio de Distrofina por Western Blot

- Variaciones en el tamaño y cuantificación



DMB



# Western-Blot

- ◆ En la práctica, rara vez se usa para evaluar la distrofina mediante WB en los casos de Duchenne, dado que la ausencia de la proteína puede demostrarse fácilmente por inmunohistoquímica.
- ◆ Algunos casos de Duchenne muestran una banda débil de la distrofina en WB y se ha sugerido la cantidad puede explicar algunas de las variaciones en severidad en la enfermedad de Duchenne
- ◆ Puede ser mas sensible que IHQ para cuantificación y detección de proteína funcional.

# **Biopsia muscular SI o NO**

# Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management



**Sospecha clínica Distrofinopatía  
/Elevación marcada CPK**

**→ No**  
**→ Si**  
**→ Excepción**

**MLPA (estudio  
deleciones-inserciones)  
positiva**

**BIOPSIA MUSCULAR/**

**→ NO alteración Distrofina**

**→ No  
Distrofinopatía:  
otros Dx.**

**Secuenciación positiva**

**CONFIRMACIÓN DIAGNÓSTICA  
Distrofinopatía**



# Biopsia muscular: SI

- La ruta para confirmar el diagnóstico depende la disponibilidad local de las pruebas rápidas y fiables.
- Descartar diagnósticos alternativos como otros tipos de distrofia muscular u otras miopatías.

# Biopsia muscular: NO

- ◆ La biopsia muscular tiene algunas limitaciones: se realiza bajo anestesia general o local, moderadamente invasiva...
- ◆ La biopsia muscular no es necesaria si existe un diagnóstico genético establecido.
- ◆ El estudio genético siempre necesario, incluso si se ha confirmado DMD por la ausencia de distrofina en la biopsia muscular.

# Biopsia muscular: SI

- ◆ Sin embargo, si la sospecha clínica es alta, incluso con estudio genético completo es negativo, es necesario hacer una biopsia muscular.
- ◆ El diagnóstico distrofinopatía puede ser **confirmada** por la ausencia de distrofina en la biopsia muscular, incluso si el todo el estudio genético es negativo.



# Biopsia muscular: SI

- ◆ Plantear biopsia en casos negativos con MLPA antes de secuenciación...Nuevas técnicas de secuenciación (NGS)???
- ◆ Tiene ventaja de la disponibilidad de tejido.
- ◆ Ensayos Clínicos (para pre y post demasiado ver cambio en distrofina )

# Biopsia muscular: SI

- ◆ VALOR PRONÓSTICO: La biopsia muscular puede proporcionar información para diferenciar ausencia total (Duchenne) y parcial de la distrofina (Becker).
- ◆ Cantidad distrofina en casos evolución atípica..o discordancia con Diagnóstico molecular.

# Biopsia muscular: SI

- ◆ En la mayoría de los casos de Duchenne el marco de lectura se interrumpe, mientras que el Becker se mantiene, permitiendo que el ARN sea transcrito y traducido a proteínas. Alrededor del 95% de los casos se ajustan a este dogma, pero hay varias excepciones.
- ◆ El diagnóstico de Duchenne y Becker no es 100% fiable basándose únicamente en el análisis molecular. Los niveles de distrofina en la biopsia muscular se pueden correlacionar mejor con el fenotipo que la "predicción genética."





Muchas gracias

