

Histoquímica enzimática en el diagnóstico de miopatías: revisión sistemática

Enzymatic histochemical in the diagnosis of myopathies: a systematic review

Doris H. Rosero-Salazar MSc¹,
Liliana Salazar-Monsalve MSc², María A. Tovar-Sánchez MD³

Introducción: Las enfermedades del músculo esquelético en las que la lesión supera la capacidad de adaptación conducen a cambios patológicos propios de las miopatías. En Colombia el diagnóstico se realiza mediante tinción con hematoxilina-eosina; sin embargo, la información brindada sobre algunos de los cambios del tejido muscular es limitada, por lo que es necesario realizar algunas técnicas de histoquímica enzimática según la alteración. **Objetivo:** Describir los criterios de tinción de diferentes técnicas histoquímicas en el diagnóstico de las miopatías. **Materiales y métodos:** Se realizó una revisión sistemática mediante la búsqueda de artículos en inglés y español indexados en las bases de ISI Web of Science, Ovid Medline, PubMed, ScienceDirect y EBSCO. Los descriptores MeSH utilizados fueron: «histochemistry», «skeletal muscle», «structural and congenital myopathies», «fiber type fast twitch», «fiber type slow twitch» y «NADH tetrazolium reductase». Se asociaron a la búsqueda los términos «clinical application» y «diagnosis». Se seleccionaron los artículos originales, reportes de casos y revisiones publicadas entre 1982 y 2014 que aplicaran las técnicas de histoquímica en el diagnóstico de una miopatía o en la investigación biomédica. **Resultados:** Se seleccionaron 64 publicaciones (incluidos dos libros) que fueron representativos para la redacción de este manuscrito, el cual fue complementado con imágenes de biopsias musculares procesadas en el Laboratorio de Histología de la Universidad del Valle, Colombia. **Conclusiones:** Un protocolo estandarizado con técnicas de histoquímica convencional y enzimática, asociado a los criterios patológicos, permite orientar el diagnóstico de las miopatías oportunamente y a un menor costo respecto a otras técnicas disponibles.

Palabras clave: NAD, músculo esquelético, distrofias musculares, miosinas, miopatía, inmunohistoquímica.

Introduction: The injuries on skeletal muscle that go beyond their capacity to adapt result in characteristic pathological changes of the myopathies. In Colombia for their diagnosis is usually used the hematoxylin-eosin stain, however, the information about many changes in muscle tissue is limited. That is why it is necessary to carry out certain enzymatic histochemical staining according to each myopathy. **Objective:** To describe the different criteria to diagnose myopathies by histochemical techniques. **Material and methods:** A systematic review was conducted which focused on search of all articles written in English and Spanish indexed in ISI Web of Science database, Ovid Medline, PubMed, ScienceDirect, and EBSCO. The MeSH descriptors used for the search were «histochemistry», «skeletal muscle», «structural and congenital myopathies», «fast twitch fiber type», «slow twitch fiber type», and «NADH tetrazolium reductase». The terms «clinical application» and «diagnosis» were associated to the search. All original articles, case reports, and reviews published during 1982-2014, which imple-

¹ Enfermera, MSc en Ciencias Biomédicas. Grupo de investigación Tejidos Blandos y Mineralizados, Departamento de Morfología, Universidad del Valle. Cali, Colombia. e-mail: doris.rosero@correounalvalle.edu.co

² Fisioterapeuta, MSc en Morfología. Grupo de investigación Tejidos Blandos y Mineralizados, Departamento de Morfología, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

³ Médica, cirujana, especialista en Medicina Física y Rehabilitación, especialista en Docencia Universitaria. Departamento de Medicina Física y Rehabilitación, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

Conflictos de intereses: los autores declaran que no tienen conflicto de intereses
Medicina & Laboratorio 2014; 20: 467-488

Módulo 14 (Tecnología), número 18. Editora Médica Colombiana S.A. 2014®
Recibido el 03 de octubre de 2014; aceptado el 29 de octubre de 2014

mented histochemical techniques to the diagnosis of myopathy or to biomedical research were included.

Results: From systematic search, 64 publications (including two books) were representative for the drafting of this manuscript. The article was supplemented with images from muscle biopsies processed by the Laboratory of Histology, Universidad del Valle, Colombia. **Conclusions:** Standardization of protocols of histochemical techniques, together with pathologic criteria, can guide the diagnosis of myopathies in a timely manner and at low-cost compared with other available techniques.

Key words: NAD, skeletal muscle, muscular dystrophies, myosin, myopathy, immunohistochemistry.

Rosero-Salazar DH, Salazar-Monsalve L, Tovar-Sánchez MA. Histoquímica enzimática en el diagnóstico de miopatías: revisión sistemática. *Medicina & Laboratorio* 2014; 20: 467-488.

Las enfermedades del músculo esquelético en las que la lesión superan la capacidad de adaptación y regeneración conducen a los cambios patológicos propios de una miopatía, como la fibrosis y el reemplazo de las fibras musculares por tejido adiposo [1,2]. El tejido muscular estriado esquelético presenta la asociación entre los miocitos (fibras musculares), proteínas estructurales y tejido conectivo como parte de su constitución morfológica, lo que le provee la estabilidad mecánica necesaria para ejercer la función contráctil [3,4]. De esta manera, es importante conocer las características histológicas normales de este tejido para establecer los parámetros anormales indicativos de una alteración tisular propia de una miopatía. El análisis de las biopsias musculares evidencia que los patrones microscópicos de alteraciones en el tejido se manifiestan como cambios en la forma y el tamaño celular, en la proporción de las fibras, la constitución del tejido conectivo y, en algunos casos, la acumulación intracelular de otros elementos como el glucógeno [5].

Las miopatías son en su mayoría de origen genético y producen en el paciente limitaciones con incapacidades permanentes que ameritan la intervención de un equipo multidisciplinario y especializado, lo que representa un alto costo para el sistema de salud [6]. En los diferentes laboratorios de Colombia la fijación con formol y la tinción con hematoxilina-eosina son métodos comúnmente usados en el estudio de las biopsias musculares, que si bien determinan la calidad del procesamiento de la muestra, brindan una información limitada sobre muchos de los cambios que ocurren en el tejido muscular; razón por la cual las técnicas de histoquímica enzimática habrían de incluirse entre las pruebas rutinarias para el diagnóstico de las miopatías. Por tal razón, es necesario conocer las técnicas de histoquímica enzimática indicadas para la identificación y el diagnóstico diferencial de las miopatías en los pacientes con signos de enfermedad muscular. En el presente artículo se reportan los hallazgos de una revisión bibliográfica sistemática sobre las características de normalidad y anormalidad del tejido muscular estriado esquelético, evidenciadas por medio de técnicas de histoquímica enzimática que son posibles de realizar en nuestro país y que proveen herramientas significativas para el diagnóstico de las miopatías.

Materiales y métodos

Búsqueda de la información

Se realizó una revisión sistemática de los artículos indexados en las bases de datos ISI Web of Science, Ovid Medline, PubMed, ScienceDirect y EBSCO entre los años 1982 y 2014. La búsqueda se limitó a artículos originales y reportes de caso, en inglés y en español, en los que una o varias técnicas de histoquímica enzimática se requirieron para establecer el diagnóstico de una miopatía. Además, se incluyeron los artículos de revisión que contenían información relevante sobre el procesamiento de las muestras y la investigación biomédica, y en los que

se describieron las características de determinados músculos con base en la histoquímica convencional y enzimática. De igual manera, se revisaron libros que describieran los fundamentos de las tinciones histoquímicas seleccionadas en la búsqueda.

Los descriptores MeSH utilizados fueron «*histochemistry*», «*skeletal muscle*», «*structural and congenital myopathies*», «*fast twitch fiber type*», «*slow twitch fiber type*» y «*NADH tetrazolium reductase*». Se asociaron a la búsqueda los términos «*clinical application*» y «*diagnosis*». Las publicaciones encontradas fueron revisadas y algunas de ellas seleccionadas para la redacción de este manuscrito. Para el almacenamiento e inclusión de las referencias bibliográficas se utilizó el software de acceso libre EndNote Web (Thomson Reuters, Nueva York, Estados Unidos).

Obtención de las imágenes

Las imágenes de diferentes casos de biopsias musculares se obtuvieron de muestras procesadas en el Laboratorio de Histología de la Universidad del Valle, Cali, Colombia. De cada una de ellas se comparte sólo el diagnóstico patológico debido al carácter confidencial de la información. El software de toma de imágenes utilizado fue LAS V3.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) adaptado a un microscopio de luz Leica DM750 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), con cámara digital Leica DFC295 (Leica Microsystems Wetzlar, Alemania).

Resultados y discusión

La búsqueda mediante los descriptores MeSH seleccionados arrojó un resultado total de 3.595 artículos, distribuidos en: 543 artículos en ScienceDirect, 1.097 en PubMed, 1.930 en OVID Medline, 13 en EBSCO y 12 en ISI Web of Science. Se descartaron 3.531 artículos que hacían referencia a técnicas de histoquímica aplicadas a otros órganos, como corazón e hígado, y los que hacían énfasis a marcadores de inmunohistoquímica exclusivamente, como fue el caso de la mayoría de los resultados de la búsqueda. Se revisó y seleccionó el texto completo de 64 publicaciones (incluidos dos libros) que mencionaban las técnicas de histoquímica en el diagnóstico de una miopatía o en la investigación biomédica, los cuales se seleccionaron y clasificaron por temáticas para la redacción de la presente revisión (ver figura 1), en la que se incluyó la descripción de los fundamentos de las tinciones histoquímicas descritas en los libros publicados por Dubowitz y colaboradores [5] y García del Moral y colaboradores [7], acompañada de imágenes de biopsias musculares procesadas por el Laboratorio de Histología de la Universidad del Valle.

Constitución histológica normal del tejido muscular estriado esquelético

La determinación de las características de normalidad en los tejidos implica tener en cuenta tanto el componente celular como la constitución de la matriz extracelular que le provee el soporte estructural y nutricional. Las células que forman el músculo esquelético son conocidas como miocitos esqueléticos o fibras musculares esqueléticas, las cuales son fusiformes y multinucleadas, y se observan cilíndricas en el plano longitudinal y ligeramente hexagonales en el plano transversal; de longitud y diámetro variables según el tamaño del músculo del cual forman parte, y conformadas por miofibrillas contráctiles organizadas paralelamente en su sarcoplasma (citoplasma), cuya unidad funcional son los sarcómeros que contienen los filamentos de actina contráctiles (ver figura 2) [2].

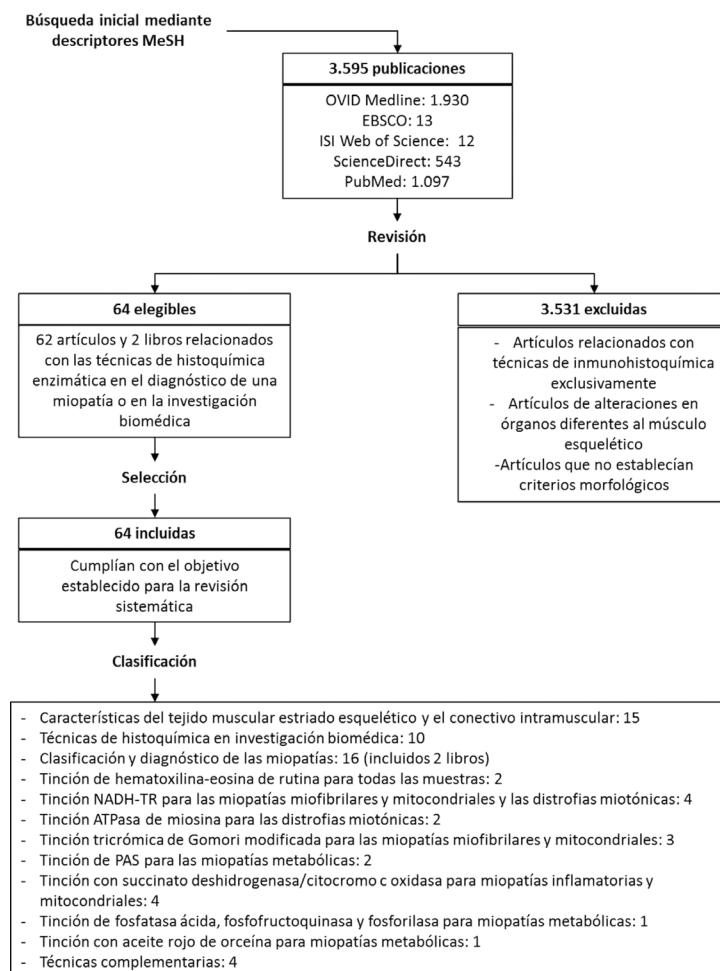


Figura 1. Flujograma de la revisión sistemática de la literatura sobre histoquímica enzimática en el diagnóstico de miopatías.

La distrofina es una proteína encargada de unir los filamentos de actina del citoesqueleto a las glucoproteínas asociadas a la distrofina, entre ellas la distrobrevina, los sarcoglicanos (α , β , γ y δ) y las sintrofinas (α y $\beta 1$), y al distroglicano (α y β); proteínas que junto al sarcospano forman el complejo distrofina-glucoproteínas, el cual se encuentra asociado al sarcolema (membrana muscular) y a las proteínas de la matriz extracelular de la lámina basal, para proveer estabilidad mecánica a cada fibra durante la contracción muscular del músculo esquelético (ver figura 2) [2,8-10].

Actualmente, se considera que otras proteínas del sarcolema, como la caveolina-3 (CAV-3) y la disferlina (DYSF), se encuentran presentes en la biogénesis de los túbulos transversales o túbulos T (invaginaciones del sarcolema) durante la miogénesis y son importantes en el funcionamiento y mantenimiento de este sistema. En algunas miopatías, como la disferlinopatía, se encuentran alteraciones en el túbulos transverso con acumulación de vacuolas subsarcolémicas adyacentes al sistema de túbulos, que generan respuestas inflamatorias acompañadas de contracciones lentas [12,13], que al inicio puede enmascararse como una polimiositis [12,14].

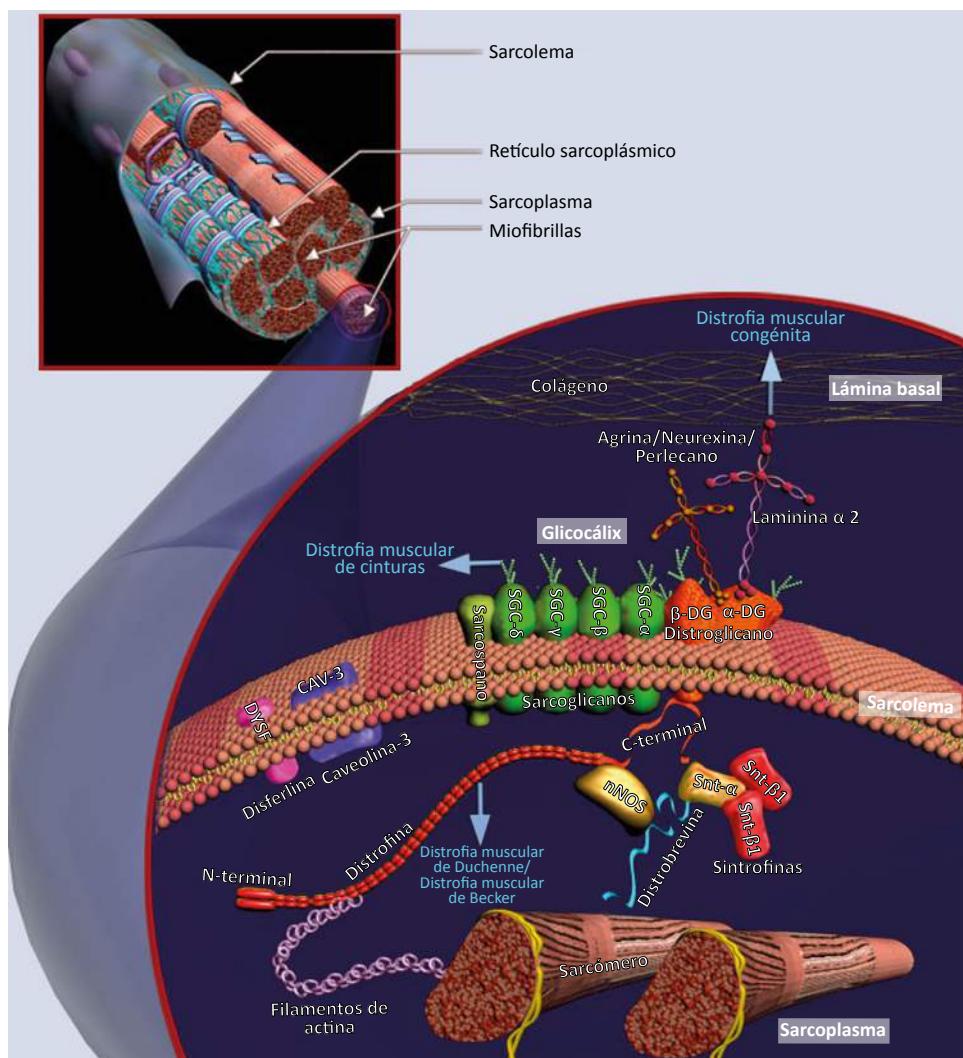


Figura 2. Complejo distrofina-glucoproteína. Se presenta la constitución molecular del complejo en función de la organización del componente miofibrilar, su relación con la lámina basal, la matriz extracelular (endomisio) y los tipos de miopatías que se presentan según las alteraciones en determinadas proteínas del complejo. Tomada y modificada de QIAGEN © 2009, todos los derechos reservados [11].

La matriz extracelular es un componente importante del tejido conectivo intramuscular, constituido en mayor proporción por fibras de colágeno tipo I, III, IV, V y XII, además de fibras elásticas, glucosaminoglucanos, como el dermatán sulfato, el heparán sulfato y el ácido hialurónico, proteoglicanos, como la decorina y el agrecano, y glucoproteínas como las lamininas y la fibronectina; los cuales se encuentran en un recambio constante [15,16]. El equilibrio entre la síntesis, la remodelación y la degradación de estos elementos le confieren la capacidad de adaptación en respuesta a diferentes estímulos, como la actividad física, el envejecimiento o una lesión, para dar continuidad a la función de transmitir la fuerza generada por las fibras musculares a otras estructuras como los tendones [16,17]. El tejido conectivo que rodea a los miocitos (fibras musculares) corresponde al endomisio; el que envuelve a los fascículos musculares (grupos de fibras musculares) al perimisio y el que se encuentra alrededor del músculo en sí, al epimisio (ver figura 3) [2].

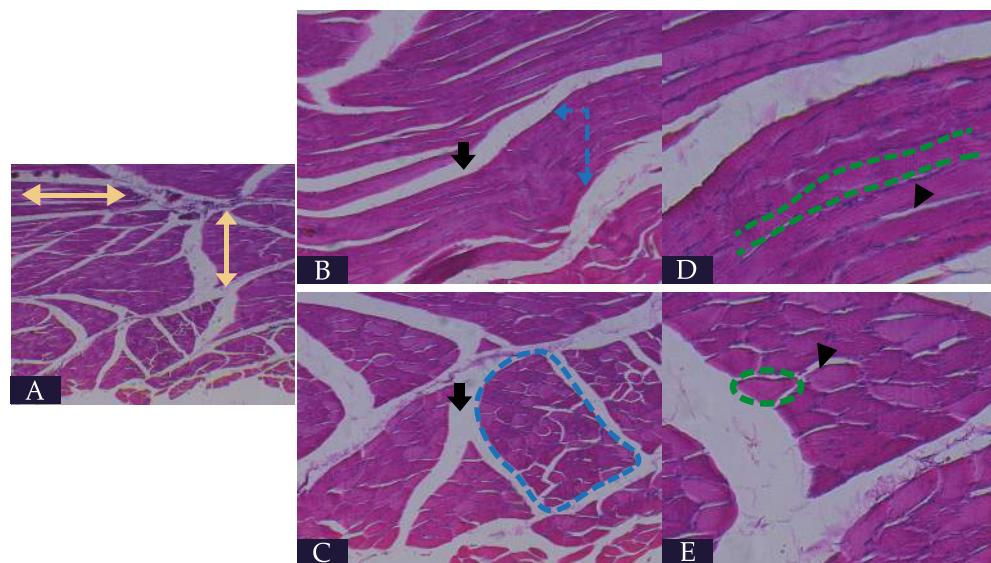


Figura 3. Preparados histológicos de un tejido muscular estriado esquelético en condiciones de normalidad con tinción de hematoxilina-eosina. **A.** Microfotografía adquirida en aumento de 4x, escala de 100 μm . La flecha doble horizontal muestra una región de fibras musculares en el campo microscópico con orientación longitudinal. La flecha doble vertical señala una región de fibras musculares con orientación transversal. **B** y **C**. Microfotografía adquirida en aumento de 10x, escala de 50 μm . Las líneas punteadas azul indican la presencia de los fascículos musculares con orientación longitudinal (**B**) y con orientación transversal (**C**), y las flechas negras el perimisio. **D** y **E**. Acercamientos de los fascículos musculares. Las líneas punteadas verde señalan los miocitos esqueléticos con orientación longitudinal (**D**), nótese la disposición paralela de las fibras, y con orientación transversal (**E**), obsérvese la forma ligeramente hexagonal. Las flechas negras señalan el endomisio. En ambas imágenes (**D** y **E**) es posible visualizar los múltiples núcleos con tinción basófila en la periferia de las fibras musculares. No se observa el epimisio.

Scott W. (2001) [18], Vivo J. (2004) [19], Hebling A. (2006) [20], Carmo-Araujo E.M. (2007) [21], De Freitas C.E.A. (2009) [22], Cornachione A.S. (2014) [23] y sus respectivos colaboradores, utilizando las técnicas de histoquímica enzimática, demostraron que los músculos esqueléticos presentan tres tipos de fibras (I, IIA y IIB) diferenciadas según su función y localización. Las fibras de contracción rápida o tipo IIB han sido relacionadas con el metabolismo glucolítico y presentan la isoforma IIb de la cadena pesada de la miosina (MHC, del inglés *myosin heavy chain*); las de contracción intermedia o tipo IIA con el metabolismo glucolítico y oxidativo, y la isoforma MHC IIa; y las de contracción lenta o tipo I con el metabolismo oxidativo y la isoforma MHC I (ver figura 4) [18-22].

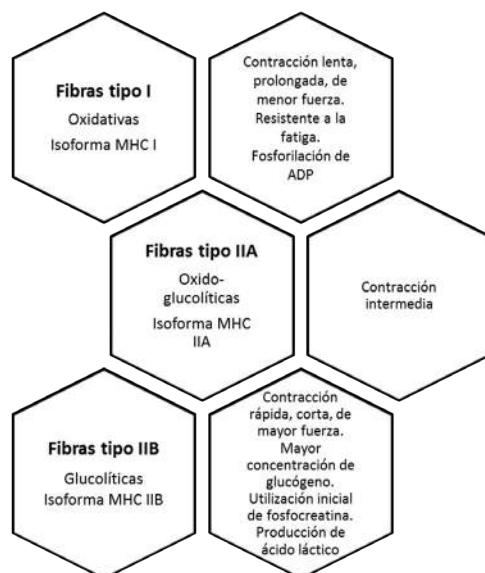


Figura 4. Clasificación de las fibras musculares. MHC = cadena pesada de miosina.

Hebling y colaboradores (2006) [20] y Carmo-Araujo y colaboradores (2007) [21], utilizando la tinción de la nicotinamida adenina dinucleótido reducida-tetrazolio reductasa (NADH-TR), al igual que Lexell y colaboradores (1994) [24] y Soukup y colaboradores (2002) [25], aplicando la tinción de la enzima adenosina trifosfatasa de miosina (m-ATPasa), determinaron el predominio de las fibras tipo IIB en diferentes músculos esqueléticos, entre ellos los extensores, y la prevalencia de las fibras oxidativas en los flexores (ver figura 5). Las muestras de músculo semitendinoso de cerdos procesadas para el estudio histoquímico y analizadas por Grazzioti y colaboradores (2009) [26], utilizando un software de análisis de imágenes, presentaron fibras musculares con una distribución en el eje latero-medial, con predominio de las fibras tipo I y tipo IIA en las regiones mediales, y de las fibras tipo IIB en las regiones más laterales, lo que permite considerar que el metabolismo del músculo semitendinoso es principalmente oxidativo.

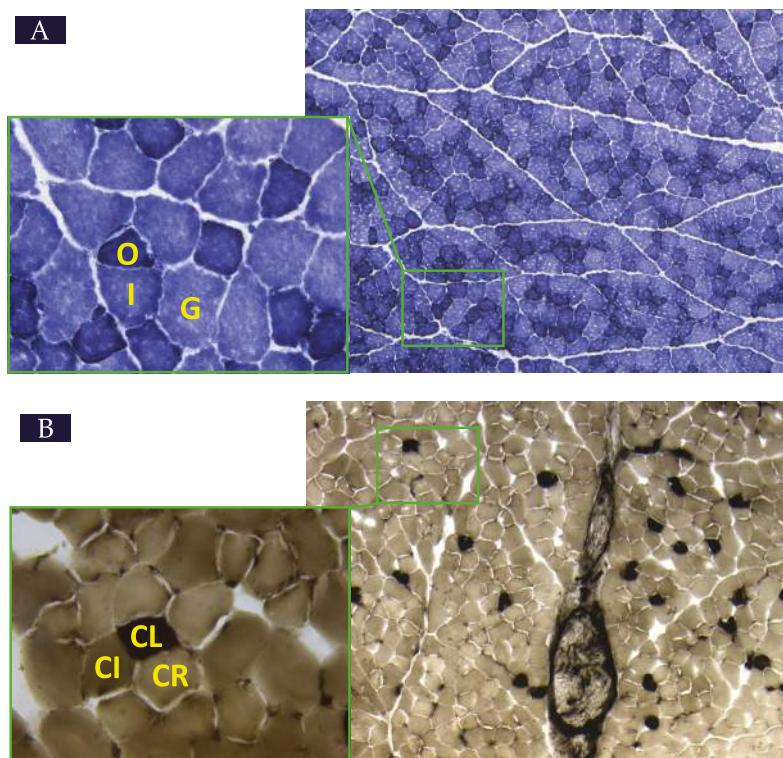


Figura 5. Distribución de las fibras de contracción rápida, intermedia y lenta en un músculo extensor radial largo del carpo con tinción de NADH-TR (A) y tinción de m-ATPasa, pH 4,6 (B). Aumento de 10x, escala de 30 μm , con acercamiento a los miocitos. Nótese la predominancia del metabolismo glucolítico y la diferente intensidad de la reacción en cada tipo de fibra muscular. O = fibra oxidativa (tipo I), G = fibra gluconéogénica (tipo IIB), I = fibra intermedia (tipo IIA), CR = contracción rápida (tipo IIB), CI = contracción intermedia (tipo IIA) y CL = contracción lenta (tipo I). La muestra fue procesada en el Laboratorio de Histología de la Universidad del Valle, durante la investigación sobre histoquímica enzimática titulada “Evaluación de músculos esqueléticos sometidos a isquemia y reperfusión: análisis histoquímico y morfométrico” (Universidad del Valle).

Alteraciones y criterios de clasificación de las miopatías

Las alteraciones en la ultraestructura de las fibras musculares afectan negativamente la contracción y producen enfermedades que se manifiestan como una debilidad muscular

secundaria a la disminución en la fuerza contráctil que inicia en los músculos distales. En su mayoría se presentan por causas inflamatorias, congénitas, metabólicas, mitocondriales, distrofias musculares y necrosis. La degeneración progresiva primaria o secundaria conlleva al reemplazo de las fibras lesionadas por tejido conectivo y adipocitos, lo que ocasiona, finalmente, la pérdida de la funcionalidad del músculo esquelético [2,27].

La clasificación de las miopatías debe tener en cuenta si es causada por defectos estructurales, congénitos, metabólicos e inflamatorios, entre otros [28]. En las distrofias musculares se observan cambios degenerativos en las miofibrillas, como aumento del tejido conectivo en forma de fibrosis intersticial, incremento de la regeneración de las miofibrillas y de los miocitos con núcleos centrales [29]. En las miopatías congénitas se encuentran defectuosos los genes que codifican para las glicosiltransferasas, enzimas que participan de la o-glicosilación de las proteínas, entre ellas el alfa-distroglicano. En las miopatías de membrana se encuentran alteraciones en la estructura de proteínas como la disferlina y el sarcoglicano [8,29]; en las miopatías inflamatorias se presentan cambios degenerativos, atróficos e hipertróficos de las fibras, e infiltrados inflamatorios [2]; y, en las miopatías metabólicas por deficiencia de enzimas como la fosfofructoquinasa y la lactato deshidrogenasa se presenta acumulación de glucógeno (ver figura 6) [30].

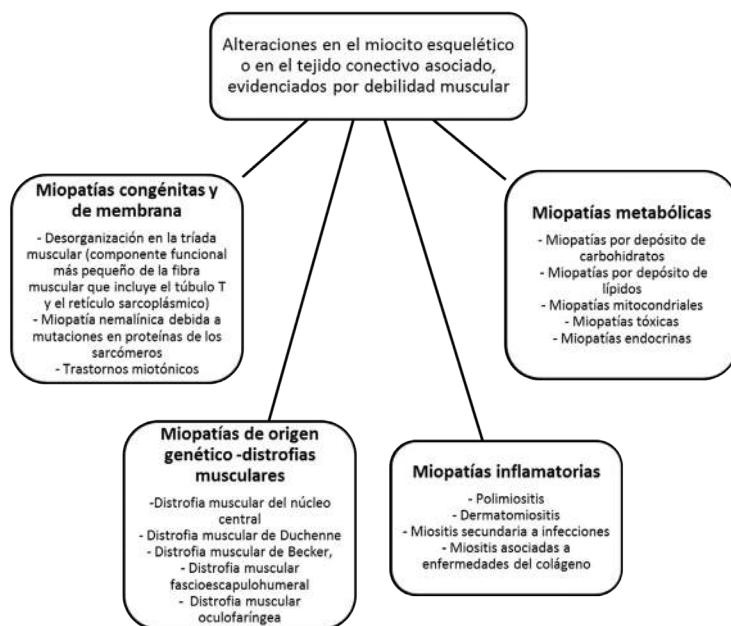


Figura 6. Esquema de la clasificación de las miopatías.

El diagnóstico diferencial de las miopatías depende de la edad de aparición, el patrón hereditario, el curso de la enfermedad y la distribución de la debilidad muscular en el paciente [31]. La electromiografía y la biopsia muscular ayudan a la confirmación del diagnóstico [28,32,33]; los exámenes sanguíneos de creatina quinasa son de gran utilidad [28], además de las pruebas de función tiroidea y electrolitos séricos, especialmente en los casos de parálisis periódicas [28,32,33]. El trabajo interdisciplinario para la correlación de los exámenes clínicos y paraclínicos, incluida la biopsia muscular para el estudio histológico, es fundamental para establecer el diagnóstico médico.

Reacciones histoquímicas aplicadas al diagnóstico de las miopatías

La importancia de las técnicas histoquímicas enzimáticas para el estudio de las biopsias musculares se resume en cuatro aspectos: *i)* demuestran la naturaleza no uniforme del músculo, señalando las características bioquímicas de un tipo específico de fibra y su rol en el desarrollo de los procesos patológicos; *ii)* detectan la ausencia de la actividad de una enzima específica; *iii)* revelan el exceso de un sustrato determinado secundario a una alteración enzimática; y, *iv)* muestran los cambios estructurales en las fibras musculares que no son evidentes con las tinciones no enzimáticas utilizadas de rutina [34].

La obtención de una muestra de músculo para biopsia adecuada es el aspecto más relevante para lograr resultados histoquímicos apreciables [35]. Para esto, el espécimen debe tomarse de una región en la que se observe la mayor proporción de fibras musculares conservadas posibles, que ayuden a determinar la calidad del procesamiento de la muestra y la aplicación correcta de los reactivos de tinción, y de esta manera, al diagnóstico adecuado por parte del médico patólogo. Además, debe evitarse obtener la muestra de un sitio en el que se hayan realizado electromiografías y punciones, o haya sido sometido a trauma. En el caso de las personas con un cuadro crónico de miopatía, con pérdida progresiva de la movilidad, es necesario realizar una evaluación imaginológica previa para seleccionar los posibles sitios en los que puedan encontrarse fibras musculares conservadas para extraer la fracción de estudio [28].

La muestra obtenida de músculo debe secarse, colocarse en un recipiente seco y transportarse en nevera portátil al laboratorio en un período inferior a una hora; tiempo en el cual debe realizarse la fijación y la inclusión por congelación a -80 °C, disponiendo las fibras en una orientación transversal. Posteriormente, se realizan cortes finos de 8 µm a 10 µm de grosor y se someten a las tinciones histoquímicas convencionales y a las enzimáticas [36]. La fijación con formol o similares altera la composición enzimática de las fibras, que en el caso de tinciones como la citocromo C oxidasa puede producir resultados negativos, por lo que no se recomienda su uso en este tipo de biopsias [5].

Un buen estudio histoquímico implica el adecuado procedimiento de preparación histológica que inicia con la biopsia muscular, la cual está indicada como procedimiento paraclínico en el diagnóstico de las distrofias musculares, las polimiositis, las miopatías mitocondriales, inflamatorias, congénitas, metabólicas o por toxicidad a medicamentos, la rabdomiólisis, la distrofia muscular neurogénica y en los niños hipotónicos; continúa con la tinción de las muestras procesadas y finaliza con la realización del diagnóstico por parte del médico especialista [37,38].

Las tinciones de histoquímica convencionales corresponden a la hematoxilina-eosina y la tricrómica de Gomori modificada, entre las secundarias o especiales se encuentra el ácido peryódico de Schiff (PAS) modificado y las enzimáticas incluyen la NADH-TR, la ATPasa de miosina a pH básico de 9,4 a 10,5 y la ATPasa de miosina a pH ácido de 4,3 a 4,6. Además, se aplican las reacciones con la enzima citocromo C oxidasa, específica para las miopatías mitocondriales, y la succinato deshidrogenasa (SDH), la cual además de tener un patrón de tinción similar a la NADH-TR es sensible a la proliferación mitocondrial. Cada tinción aporta información relevante para la caracterización de las miopatías y, por ende, se recomienda seleccionar las tinciones y pruebas suficientes que ayuden a la confirmación del diagnóstico.

[28,37,39]. Weidenheim K.M. (2014) [40] y Siepmann y colaboradores (2013) [41] describen varias tinciones tanto de histoquímica convencional como enzimática; además, de algunas pruebas de inmunohistoquímica útiles en el diagnóstico de algunos trastornos del músculo esquelético. En la **tabla 1** se resumen las características que cada técnica de histoquímica permite establecer en el estudio del tejido muscular.

Tabla 1. Tinciones histoquímicas y propiedades tisulares que evidencian

Reacción	Características
Hematoxilina-eosina	Identifica la estructura de las fibras, tamaño y contorno, posición de los núcleos, presencia de infiltrados inflamatorios y fibrosis
Tricrómica de Gomori modificada	Identifica la estructura anormal, cambios en el tejido conectivo, fibras rojas rasgadas y cuerpos nemalínicos
ATPasa de miosina (m-ATPasa)	Distribución de las fibras según el tipo de contracción, incluso en aquellas con atrofia selectiva
NADH-TR	Diferencia las fibras según el tipo de metabolismo e identifica agregados tubulares y mitocondriales
PAS modificado	Distingue las fibras según su contenido de glucógeno
Succinato deshidrogenasa (SDH)	Diferencia entre el tipo de fibras, identifica las fibras con acumulación mitocondrial anormal. Útil en la caracterización de las miopatías mitocondriales
Citocromo C oxidasa	Diferencia entre el tipo de fibras, identifica las fibras con acumulación mitocondrial anormal y con carencia de actividad enzimática. Específica de miopatías mitocondriales
Aceita roja de orceína	Identifica la presencia de lípidos intracelulares
Fosfatasa ácida	Identifica fibras necróticas
Fosfofructoquinasa y miofosforilasa	Identifican la presencia de glucógeno intracelular y alteraciones en la glucogénesis

Tomado y modificado de [28], [34] y [39]

En la **tabla 2** se describen las características de las técnicas de histoquímica enzimática descritas en los estudios incluidos en la revisión bibliográfica sistemática sobre la histoquímica en el diagnóstico y la investigación clínica de las miopatías.

La hematoxilina-eosina es la tinción de rutina más utilizada para la identificación de las estructuras que forman parte del tejido a estudiar, la localización de las células mediante la coloración de sus núcleos y la distribución de los tejidos fundamentales tanto con fines académicos como clínicos. El método supone la aplicación del colorante hematoxilina, el cual al ser una sustancia catiónica o básica tiñe en tonos azul y púrpura las estructuras ácidas (basófilas), como los núcleos celulares; y el uso de la eosina que gracias a su naturaleza aniónica o ácida tiñe en tonos de color rosa los componentes básicos (acidófilos), como las fibras musculares y el tejido conectivo [5,7]. Esta tinción hace parte de las técnicas de confirmación del diagnóstico de miopatías, debido a que permite determinar la estructura general del tejido muscular, el tamaño, el contorno y el diámetro de las fibras musculares y la presencia de infiltrado inflamatorio [37].

Tabla 2. Hallazgos de la histoquímica en los estudios incluidos en la revisión bibliográfica sistemática

Tinciones	Tipo de estudio	Miopatía	Técnica complementaria (estándar de comparación)	Diagnóstico diferencial	Resultados	Ref.
Aceite rojo de orceína, NADH-TR, hematoxilina-eosina, citocromo C oxidasa, succinato deshidrogenasa	Reporte de caso	Acumulación neutral de lípidos con miopatía	Microscopía electrónica y secuenciación del gen <i>PNPLA2</i>	Miopatía mitocondrial	Fibras vacuoladas con aumento de vesículas lipídicas citoplasmáticas con hematoxilina-eosina y aceite rojo de orceína	[42]
					Confirmación por microscopía electrónica	
					Enzimas de la cadena respiratoria normales	
Hematoxilina-eosina	Revisión en polimiositis	Polimiositis	Inmunohistoquímica positivo MHC1, anti-aminoacil-tARN sintasa	Enfermedades neurogénicas, miopatías metabólicas, por exposición miotóxica, enfermedades endocrinas e infecciones	El 85% de los casos diagnosticados mediante histopatología convencional	[14]
					El 15% son falsos positivos, prevenibles mediante una buena historia clínica	
Hematoxilina-eosina, tricrómica de Gomori, ATPasa pH 9.4, citocromo C oxidasa -succinato deshidrogenasa, PAS, NADH-TR	Prospectivo (mayo 2005-noviembre 2007)	Oftalmoplejía externa mitocondrial	Secuenciación del ADN mitocondrial y tARN	Causa neuropática	El 75% diagnosticados mediante histoquímica convencional	[43]
					El 25% falsos negativos. Se requiere complementar con estudios moleculares. La causa neuropática puede no evidenciar la alteración mitocondrial.	
					Citocromo C oxidasa -succinato deshidrogenasa prueba más sensible de la enfermedad miopática mitocondrial	
PAS	Cohorte	Miopatía por glucogenosis	Secuenciación gen <i>GYG1</i> , microscopía electrónica e inmunohistoquímica para desmina y ubiquitina		El 40% de las fibras musculares PAS positivas, compatible con acumulación de cuerpos de poliglucosanos.	[44]
					Deficiencia de la proteína glicogenina-1, importante en la actividad de la glucógeno sintasa	
Citocromo C oxidasa-succinato deshidrogenasa	Cohorte	Miopatía mitocondrial	Delección de los genes <i>MT-CO</i> y evaluación de heteroplasmia en el ADN mitocondrial		Correlación elevada entre el análisis molecular y la deficiencia en la función de la citocromo C oxidasa	[45]

Hematoxilina-eosina, trícromica de Gomori, citocromo C oxidasa-succinato deshidrogenasa	Cohorte	Miopatía mitocondrial	Northern blot para tARN		No todos los casos presentaron el mismo patrón de deficiencia de citocromo C oxidasa, lo cual se atribuye a las diferentes mutaciones del tARN y la heteroplasmia en el ADN mitocondrial	[46]
Hematoxilina-eosina, trícromica de Gomori, aceite rojo de orceína, fosfatasa ácida, ATPasa pH 4,3, 4,6 y 9,4, citocromo C oxidasa-succinato deshidrogenasa, NADH-TR	Cohorte	Síndrome de Leigh	Microscopía electrónica y secuenciación del gen <i>SURF1</i>		Positivo para aceite rojo de orceína y citocromo C oxidasa	[47]
					Ausencia de fibras rojas rasgadas con la trícromica de Gomori	
					Reacción positiva a la succinato deshidrogenasa o la NADH-TR, excepto en un caso. Estos hallazgos dependen de la mutación	
					La reacción de la citocromo C oxidasa debe ser parte del diagnóstico	
PAS, miofosforilasa, fosfofructoquinasa, fosfatasa ácida	Revisión en glucogenosis	Miopatías por acumulación de glucógeno	Microscopía electrónica y mutación en la enzima correspondiente	Enfermedad hepática, mioglobinuria relacionada al ejercicio, otras	Defectos enzimáticos y acumulación de vacuolas citoplasmáticas Se sugiere correlacionar con estudios bioquímicos y de laboratorio	[30]
Trícromica de Gomori	Revisión	Miopatía nemalínica y miotubular	Microscopía electrónica y mutación en el gen de miotubularina-1		Los cuerpos nemalínicos son patognomónicos. Debe complementarse con la NADH-TR La alteración ultraestructural confirma el diagnóstico	[48]
Hematoxilina-eosina, PAS	Cohorte	Enfermedad de Pompe	Microscopía electrónica e inmunofluorescencia		En esta alteración la biopsia muscular es cuestionada; sin embargo, demuestra ser una buena herramienta, pues permite identificar el daño muscular por autofagia y acumulación de inclusiones de lipofuscina Se sugiere complementar con otras técnicas	[49]

En las miopatías miotubulares la tinción de hematoxilina-eosina permite observar los núcleos con localización central que asemejan los miotubos durante la diferenciación celular en la etapa embrionaria [48]. En las miopatías inflamatorias, como las polimiositis, se observan infiltrados de células linfocitarias en el tejido conectivo; además, es posible visualizar las fibras en regeneración y las fibras necróticas [14]. En la distrofia muscular de Duchenne algunas fibras se observan más grandes, necróticas y con invasión macrofagocitaria; y otras se encuentran granulares y con un nucléolo prominente, indicativo de regeneración, y con el endomisio fibrótico con aumento del espacio que ocupa [5]. La figura 7 evidencia una miopatía por desproporción congénita de fibras.

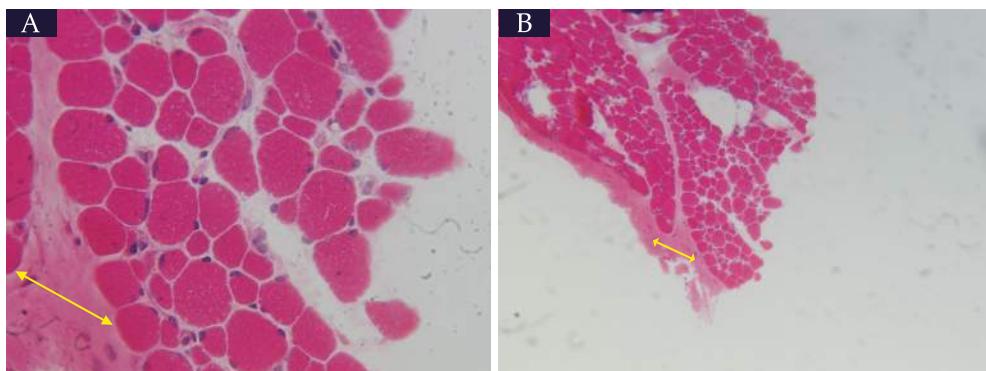


Figura 7. Músculo cuádriceps izquierdo con tinción hematoxilina-eosina diagnosticado con miopatía por desproporción congénita de fibras. Aumento 40x; escala de 30 μm (A) y aumento 10x; escala de 100 μm (B). En A se evidencian tamaños variables en los miocitos con aumento en el tejido conectivo (flecha doble) y en B desorganización del patrón normal de los fascículos musculares.

La tinción tricrómica de Gomori modificada permite identificar claramente el endomisio, el perimisio y el epimisio de color verde, debido a la reacción con la matriz extracelular intramuscular; los miocitos esqueléticos en color verde azul, y los núcleos y los acúmulos mitocondriales anormales en tonos rojizos o púrpura [5]. Las fibras rojas rasgadas, correspondientes a las fibras musculares con acumulación de mitocondrias teñidas de color rojizo y comúnmente encontradas en las miopatías mitocondriales, se observan además con bordes irregulares y deshilachados [50]. Los cuerpos nemalínicos, comúnmente identificados en la miopatía congénita nemalínica, las distrofias musculares y las miopatías inflamatorias, se evidencian como filamentos contráctiles desordenados y barras de color rojizo, localizados en el subsarcolema y cercanos a los núcleos (ver figura 8) [5].

Por su parte, los fragmentos de tejido en parafina permiten realizar el análisis histológico convencional con hematoxilina-eosina, por ejemplo, para el estudio de las miopatías inflamatorias, o de inmunohistoquímica para las distrofinopatías. Además, permite la evaluación de la matriz extracelular mediante tinciones especiales como la tricrómica de Masson, en la que el contraste dado por los reactivos verde azul o azul de anilina hacen evidente la fibrosis y la infiltración grasa. Para esta tinción se realiza el marcaje con un colorante ácido como el escarlata de Biebrich, que se une a los componentes básicos como el citoplasma de los miocitos y las fibras de colágeno, y, posteriormente, se adicionan los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibídico, que se unen a dichos componentes e inducen que el marcaje rojo difunda fuera de las fibras de colágeno, permitiendo que el reactivo verde azul o el azul de anilina se adhiera marcando-

las de este color, pero no del citoplasma de los miocitos, el cual retiene la coloración roja. La tinción tricrómica de Gomori no genera este efecto, razón por la cual no es pertinente para las muestras incluidas en parafina [5,7].

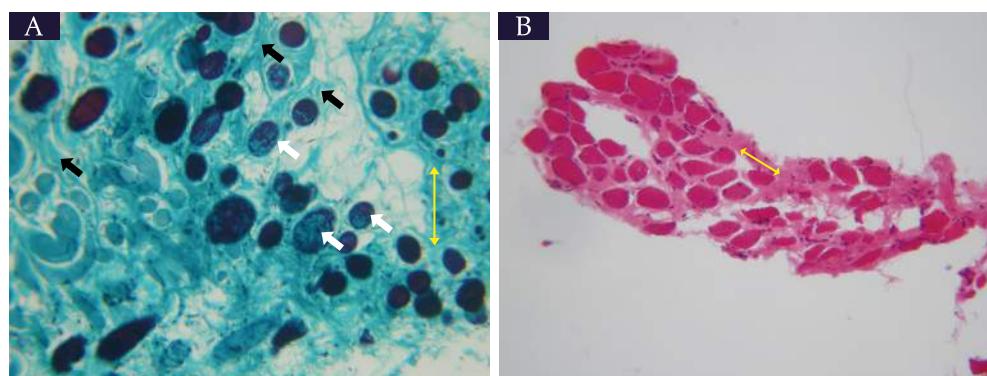


Figura 8. Músculo cuádriceps izquierdo con tinción tricrómica de Gomori modificada (A) y tinción de hematoxilina-eosina (B) diagnosticado con distrofia muscular. Aumento de 10x, escala de 100 µm. Obsérvese en A la atrofia muscular, el aumento en la proporción del tejido conectivo (flecha doble amarilla), las coloraciones azul-rojizas subsarcolémicas (flechas blancas) y las fibras colágenas gruesas y desordenadas en contraste verde (flechas negras). Nótese en B el aumento en el espacio ocupado por el tejido conectivo, correspondiente al endomisio y el perimisio (flecha doble amarilla), la atrofia muscular y las formas irregulares de las fibras.

La NADH-TR es una enzima oxidorreductasa presente en las mitocondrias de las fibras del músculo esquelético. La tinción histoquímica emplea una sal de tetrazolio soluble e incolora (usualmente nitroazul de tetrazolio) que es reducida por la enzima a formazanos insolubles de color intenso (azul) en las fibras musculares, específicamente en el sitio de la actividad [5]. Las fibras tipo I se observan con una coloración más intensa respecto a las fibras tipo II, debido a que poseen mayor proporción de mitocondrias y, por tanto, una reacción oxidativa superior (ver figura 5) [5,7,20,22,51]. Las miofibrillas se observan generalmente de color azul, lo que deja al descubierto la zona anormal del core central o periférico, que carece de mitocondrias, y de esta manera, de actividad enzimática oxidativa (ver figura 9), característica de algunas miopatías miofibrillares y congénitas [52,53]; así como los cuerpos hialinos (áreas focales granulares) negativos para la enzima y las hebras sarcoplasmáticas radiales, observadas como líneas que se irradian desde el centro de las fibras musculares y generalmente de tinción más intensa; ambos frecuentemente encontrados en algunas miopatías congénitas [53].

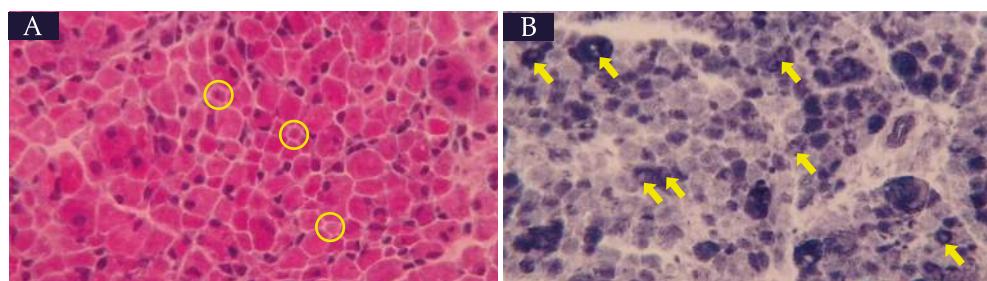


Figura 9. Músculo cuádriceps derecho con tinción hematoxilina-eosina (A) y NADH-TR (B) diagnosticado con miopatía mitocondrial. Aumento 40x, escala de 30 µm. Obsérvese en A atrofia muscular (círculos) e infiltración celular. Nótese en B la presencia del core central o periférico (flechas amarillas) con predominio de fibras tipo 1.

La ATPasa de miosina es una enzima activada por calcio, que hidroliza el ATP para formar ADP y fosfato, y que produce contracción muscular por la interacción con los filamentos de actina. El método para la localización de la actividad de la enzima en las fibras musculares se basa en la asociación del fosfato liberado al calcio proporcionado por una solución de cloruro de calcio; el intercambio del calcio por cobalto proveniente de una solución de cloruro de cobalto; y a la formación del precipitado negro de sulfuro de cobalto al añadir una solución de sulfuro de amonio [5]. La actividad de la ATPasa de miosina permite diferenciar entre las fibras musculares de contracción rápida y las de contracción lenta, de acuerdo con la forma en que cada una de ellas reacciona a la pre-incubación de la enzima en medio ácido (pH 4,6) o alcalino (pH 9,4) [5,51].

Con base en la reacción de la ATPasa de miosina, las fibras musculares se pueden clasificar en dos grupos: *i*) las ácido-estable/ alcalino-débil, correspondientes a las fibras de contracción lenta o tipo I, las cuales a pH de 9,4 se observan pálidas por la poca reactividad de la enzima a este pH, y a un pH de 4,6 se observan oscuras; y, *ii*) las ácido-débil/ alcalino-estable, correspondientes a las fibras de contracción rápida o tipo II, las cuales a pH alcalino se tiñen oscuras debido a que hidrolizan el ATP más rápido que las de contracción lenta (tipo I), y a pH ácido se visualizan pálidas [5,51]. Además, la reacción permite subclasificar las fibras tipo II en IIA y IIB según la actividad de la ATPasa de miosina a diferentes valores de pH ácido, la cual se torna negativa con mayor rapidez en las fibras tipo IIA al aumentar el grado de acidez del medio de pre-incubación (ver figura 10) [51]. Un cuarto grupo de fibras, las tipo IIC, ha sido descrito durante el desarrollo embrionario y la etapa neonatal, las cuales son reemplazadas por las fibras tipo I, IIA y IIB durante el desarrollo postnatal [51,54].

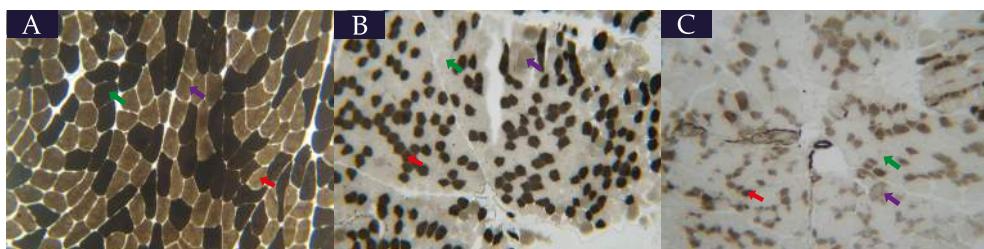


Figura 10. Músculo cuádriceps izquierdo con tinción de m-ATPasa. Aumento de 10x; escala de 100 μm . **A.** Reacción a pH 9,4. Obsérvese las fibras tipo IIB o de contracción rápida (flecha verde) con reacción más intensa que las tipo IIA (flecha violeta) y las tipo I (flecha roja). **B.** Reacción a pH 4,6. Nótese las fibras tipo I (flecha roja) con mayor reacción que las tipo IIB (flecha verde) y las tipo IIA (flecha violeta). **C.** Reacción a pH 4,3. Obsérvese que las fibras tipo I (flecha roja) continúan reaccionando con mayor intensidad que las tipo IIB (flecha verde) y las tipo IIA (flecha violeta).

La succinato deshidrogenasa (SDH) es una enzima localizada en la membrana interna mitocondrial, cuyo principio de tinción histoquímica es igual a la NADH-TR, mediante la reducción de la sal nitroazul de tetrazolio a formazanos de color azul, que marca la actividad enzimática de cada tipo de fibra. De esta manera, las fibras oxidativas (tipo I) se observan con mayor intensidad de reacción respecto a las fibras intermedias (tipo IIA) y las glucolíticas (tipo IIB) [5]. Esta técnica es más específica de las miopatías mitocondriales debido a que las fibras anormales producen una reacción débil e irregular o no la presentan [55]. La técnica combinatoria de la tinción de la succinato deshidrogenasa y de la enzima citocromo C oxidasa (COX-SDH) permite identificar en color azul las fibras anormales que carecen de la actividad de la citocromo C oxidasa, pero conservan la actividad de la succinato deshidrogenasa, mientras que las fibras normales se observan de color café debido a la oxidación del reactivo de diaminobencidina por la citocromo C oxidasa [5]. Este

hallazgo permite confirmar el diagnóstico de la enfermedad mitocondrial por deficiencia del complejo IV de la cadena respiratoria [43].

En las distrofias miotónicas, utilizando la tinción de la ATPasa de miosina, se observa atrofia de las fibras musculares con predominio de fibras tipo I de menor tamaño que las fibras tipo II; además, se encuentran áreas de diferente tamaño carentes del marcaje de la NADH-TR (ver figura 11). En las miopatías congénitas, usando la tinción de la succinato deshidrogenasa, se evidencia la variación en el tamaño de la fibra, la homogeneidad en el tipo de fibra observada, numerosas zonas claras y redondeadas en el centro de las fibras, denominadas cuerpos centrales (del inglés *central core*) [53], y halos de coloración más intensa rodeando la lesión central, principalmente en las fibras tipo I [55]. De acuerdo con Larsson y Oldfors (2001) [50], la causa primaria de la miopatía mitocondrial son las mutaciones en el ADN mitocondrial o nuclear, las cuales pueden llevar a alteraciones de alguno de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. Además, describen que las neuropatías periféricas con atrofia muscular neurogénica son la causa secundaria de este tipo de miopatía. Las manifestaciones clínicas comunes que permiten sospechar la presencia de una miopatía mitocondrial son la ptosis palpebral y la oftalmoplejía externa progresiva, que llevan a la parálisis completa de los músculos extraoculares, y la debilidad muscular asociada con rabdomiolisis y mioglobinuria [50].

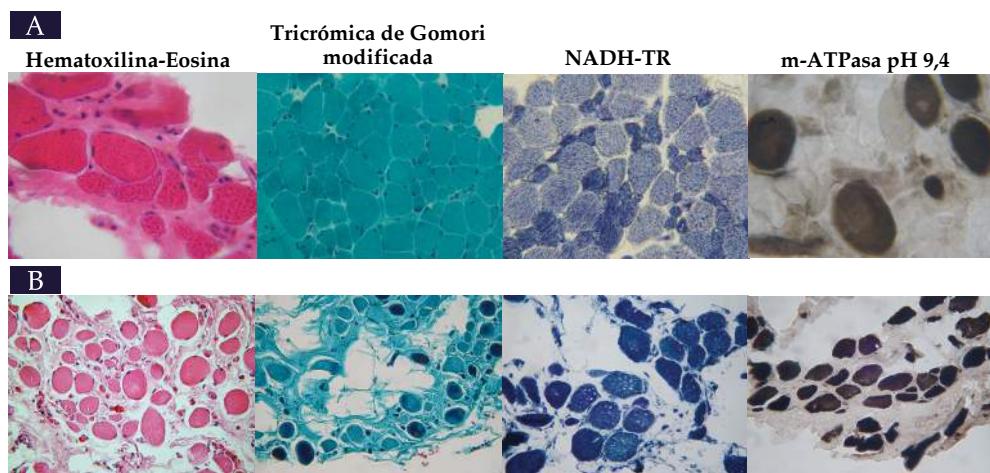


Figura 11. Músculo cuádriceps izquierdo con cambios compatibles con distrofia muscular. A. Aumento de 40x, escala de 30 μm y B. Aumento de 20x; escala de 25 μm . Nótese el reemplazo de las fibras musculares por tejido conectivo y tejido adiposo, así como el predominio oxidativo o de fibras tipo I en las tinciones de histoquímica enzimática (NADH-TR y m-ATPasa pH 9,4).

La deficiencia del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria, comúnmente causada por mutaciones en el ADN mitocondrial, cursa con un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que junto con los defectos en el complejo III (citocromo C reductasa) conducen a una lesión mitocondrial continua [56]. Wani y colaboradores (2008) [56] demostraron que la presencia de especies reactivas de oxígeno, en las líneas de células linfoblásticas derivadas de pacientes con deficiencia del complejo I, genera como mecanismo de compensación la elevación de los niveles y de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), y de la expresión de otras enzimas antioxidantes para evitar el daño causado por el estrés oxidativo; sin embargo, esta respuesta no ocurre en todos los tipos celulares. En los pacientes con defectos en el complejo

I se presentan encefalomiopatías con pérdida progresiva de la visión, debilidad muscular, movimientos oculares anormales y retraso en el desarrollo motor, entre otras características clínicas que dependen del tipo de mutación presentada en el ADN mitocondrial [56].

Las fibras rojas rasgadas, observadas comúnmente con la tinción tricrómica de Gomori y características de las miopatías mitocondriales, además de la acumulación mitocondrial subsarcolemal, presentan en su mayoría una actividad reducida del complejo IV (citocromo c oxidasa) de la cadena respiratoria, pero una alta actividad del complejo II (succinato deshidrogenasa) [57], lo que se evidencia mediante la coloración azul que adquieren estas fibras al utilizar la histoquímica enzimática dual secuencial citocromo C oxidasa/succinato deshidrogenasa [46]. Blakely y colaboradores (2013) [46] utilizaron esta doble tinción para marcar las biopsias de músculo esquelético de pacientes con enfermedad mitocondrial debida a mutaciones puntuales en el ARN de transferencia mitocondrial. Específicamente, en los pacientes con la mutación T14709C, relacionada con la disminución simultánea de la actividad enzimática de los complejos I y IV, la miopatía mitocondrial puede cursar con cardiomielitis, diabetes o neuropatía axonal [58].

La técnica de histoquímica enzimática dual secuencial citocromo C oxidasa/succinato deshidrogenasa también permite determinar la densidad de las fibras con deficiencia de la citocromo C oxidasa, la cual, según Grady y colaboradores (2014) [45], utilizando un modelo de regresión lineal múltiple, se correlaciona significativamente con las delecciones del ADN mitocondrial y de los genes mitocondriales que codifican para la citocromo C oxidasa (*MT-CO*) ($R^2 = 0,43$). Siepmann y colaboradores (2013) [41] definieron la polimiositis con alteraciones mitocondriales como la enfermedad en la que se evidencian síntomas clínicos de miositis por cuerpos de inclusión y hallazgos histológicos de polimiositis, con infiltración linfocitaria de las fibras musculares; además, el aumento de las fibras musculares con actividad deficiente de la citocromo C oxidasa y con actividad o no de la succinato deshidrogenasa, marcadas con la doble tinción enzimática. Por su parte, Sundaram y colaboradores (2011) [43] indican que la doble tinción identifica mejor las fibras anormales en el diagnóstico de la oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO) de origen mitocondrial.

La reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS) es útil para demostrar la presencia de glucógeno en el sarcoplasma (citoplasma), principalmente en las enfermedades producidas por su acumulación. El éxito de esta tinción depende de la oxidación de los grupos glicol por el ácido periódico en grupos aldehídos, los cuales reaccionan con el reactivo de Schiff (fucsina-ácido sulfuroso), produciendo una coloración rosa y muestra un patrón típico según el tipo de fibra. De esta manera, las fibras tipo II y las vacuolas con alto contenido de glucógeno en el interior de las fibras anormales adquieren una tinción rosa intensa, mientras que las fibras tipo I se observan de color rosa pálido. Además, esta técnica

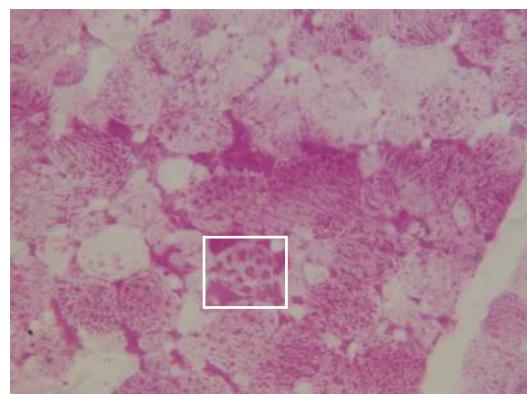


Figura 12. Músculo cuádriceps izquierdo con tinción de PAS. Aumento 40x, escala de 25 μm. El recuadro indica las acumulaciones intracelulares de glucógeno en un miocito esquelético.

destaca la red intermiofibrilar y la posición del núcleo [5]. Malfatti y colaboradores (2014) [44] describieron una nueva variación de miopatía por acumulación de glucógeno asociada a la deficiencia del gen glucogemina-1 (*GYG1*) en pacientes que presentaban signos de enfermedad muscular sin cardiomielopatía, 30% al 40% de fibras musculares marcadas con PAS con acumulación anormal de glucógeno (ver figura 12) y variantes deletéreas del gen *GYG1*.

Otras tinciones histoquímicas

La reacción con aceite rojo de orceína (ORO, del inglés *oil red O*) marca de color rojo los lípidos neutros, por lo que es de utilidad en la detección de las miopatías por almacenamiento de lípidos. La acumulación intracelular de lípidos se observa como gotas o puntos rojos de diferentes tamaños que ocupan la mayor parte de la fibra muscular y que se encuentran más abundantes en las fibras tipo I que en las tipo II [34]. Tavian y colaboradores (2013) [42] reportaron el caso de un hombre de 79 años con historia de debilidad muscular progresiva en los brazos, en el que la muestra muscular marcada con aceite rojo de orceína reveló la presencia de fibras vacuolares con gotas de lípidos que aumentaron progresivamente, las cuales fueron confirmadas por microscopía electrónica, sin hallazgos de alteración mitocondrial, y que junto con el análisis genético confirmaron el diagnóstico de una miopatía con acumulación de lípidos. Feeney y colaboradores (2014) [49] analizaron biopsias musculares de pacientes con la enfermedad de Pompe, una miopatía metabólica con alteración de la α -glucosidasa ácida, en la que se produce acumulación de glucógeno en los lisosomas e inclusiones de lipofuscina en el músculo esquelético que son positivas para el aceite rojo de orceína.

Por su parte, las tinciones de la actividad de la miofosforilasa, enzima involucrada en la degradación de glucógeno en el músculo, y de la fosfofructoquinasa, enzima reguladora de la glucólisis, son útiles en el diagnóstico de las miopatías metabólicas [59]. En las miopatías inflamatorias, además de las lesiones del endomisio y el perimisio, la atrofia perifascicular, la infiltración celular mononuclear y las regiones necróticas y de regeneración [39,60], en algunas ocasiones se observan depósitos intracelulares tanto con las tinciones de rutina como con otras tinciones complementarias, entre ellas el rojo congo, que marca los depósitos amiloideos patológicos [28,31], el aceite rojo de orceína, que tiñe los depósitos de lípidos, y la enzima lisosomal fosfatasa ácida, que indica los focos de degeneración y necrosis en las fibras musculares [28].

Técnicas no histoquímicas complementarias

Para el diagnóstico de las miopatías, además de las técnicas histoquímicas ya mencionadas, se encuentran disponibles técnicas moleculares, inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia, las cuales permiten evidenciar la alteración en una proteína específica, teniendo como ventaja el uso de anticuerpos monoclonales altamente específicos de los componentes de la membrana basal o el plasmalema. En el caso del diagnóstico de las miopatías congénitas se recomienda utilizar las técnicas de histoquímica convencional y enzimática complementadas con el uso de anticuerpos específicos para componentes del sarcolema, el sarcoplasma o la matriz extracelular [61,62].

Por su parte, la microscopía electrónica permite determinar alteraciones en las miofibrillas y la ultraestructura de las organelas, como la acumulación de mitocondrias con crestas desordenadas o de aspecto tubular, o con inclusiones en la matriz mitocondrial [41,47,50,63], la presencia de vacuolas lipídicas en el sarcoplasma [42], el almacenamiento granular de glucógeno [44], la ruptura de la membrana plasmática [12] y la presencia de infiltrado mononuclear [41], entre otros. Esta técnica, aunque costosa, provee información útil y está indicada en los casos que realmente la requieran, como el diagnóstico de las miopatías mitocondriales [41,47,50,63], con acumulación lipídica [42] y con acumulación de glucógeno [44]. Goebel y colaboradores (2013) [64] indican que la microscopía electrónica es útil en el diagnóstico de las miopatías metabólicas, congénitas e inflamatorias, pero es poco informativa en los casos de distrofias musculares, neurogénicas y miotónicas.

La microscopía confocal es otra técnica que se encuentra en auge y ha sido aplicada para la detección de cuerpos de inclusión en miopatías metabólicas, utilizando fluoróforos específicos o mediante la determinación de la autofluorescencia de los componentes tisulares o celulares presentes en la muestra [49]. Éste es un método aún más costoso que los anteriores; sin embargo, es una de las mayores perspectivas a futuro en la investigación biomédica y clínica, debido a su gran utilidad en la orientación de los diagnósticos médicos en general.

Conclusiones

Las alteraciones miopáticas afectan negativamente el equilibrio entre el estímulo y el proceso de adaptación muscular, y se manifiestan con alteración primaria o secundaria de las fibras musculares, por lo que su diagnóstico y tratamiento requieren de la correlación clínica, paraclínica y el trabajo interdisciplinario. La evidencia clínica y de investigación en el tema demuestra que las técnicas de histoquímica convencionales y enzimáticas, si bien, por sí solas no constituyen el diagnóstico de una miopatía, algunas de ellas manifiestan las características propias de la alteración del tejido en determinadas enfermedades musculares, las cuales se correlacionan con los hallazgos obtenidos con las técnicas moleculares, genéticas, entre otras.

Las técnicas de histoquímica enzimática permiten evidenciar cambios que ocurren en el tejido muscular, que no es posible visualizar con las técnicas convencionales, por lo tanto, su indicación mediante biopsia muscular puede constituir una herramienta valiosa de la evaluación histopatológica. Esto es posible siempre y cuando, se siga el protocolo establecido para el manejo de la muestra así como para el procesamiento en el laboratorio de histotecnología. De esta manera, el uso de un protocolo estandarizado con técnicas de histoquímica convencional y enzimática, asociado a los criterios patológicos que se evidencian, permite realizar un diagnóstico específico y oportuno de las miopatías, a un costo que puede ser más bajo en comparación con otras técnicas de laboratorio.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la sección de Histología del Departamento de Morfología de la Universidad del Valle y a las profesionales del Laboratorio de Histología Nhora Holguín y Martha Ceballos por su disposición y colaboración en la realización de este estudio.

Bibliografía

1. **Grounds MD.** The need to more precisely define aspects of skeletal muscle regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; Sep 19 [Epub ahead of print].
2. **Wang YX, Chang NC, Rudnicki MA.** Skeletal Muscle Remodeling and Regeneration. In: McManus LM, Mitchell RN, eds. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. Amsterdam, Holanda: Academic Press; 2014: 567-579.
3. **Jozsa L, Thöring J, Järvinen M, Kannus P, Lehto M, Kvist M.** Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: an experimental study in the rat calf muscles. *Exp Mol Pathol* 1988; 49: 267-278.
4. **Hannesson KO, Tingbø MG, Olsen RL, Enersten G, Bævre AB, Ofstad R.** An immunological study of glycosaminoglycans in the connective tissue of bovine and cod skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007; 146: 512-520.
5. **Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A.** *Muscle Biopsy: A Practical Approach: Expert Consult; Online and Print (ed 4ta)*. China: Saunders Ltd.; 2013.
6. **República de Colombia, Ministerio de Salud y Protección Social, Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación (Colciencias), Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud, Universidad de Antioquia.** Guía de práctica clínica para la detección temprana, atención integral, seguimiento y rehabilitación de pacientes con diagnóstico de distrofia muscular. 2014. Disponible: <http://gpc.minsalud.gov.co/guias/Documents/Distrofia%20Muscular/GPC-DM%2037%20para%20usuarios.pdf>. Consultado: septiembre 2014.
7. **García del Moral R.** Laboratorio de Anatomía Patológica. Madrid, España: McGraw Hill; 1996.
8. **Barresi R.** From proteins to genes: immunoanalysis in the diagnosis of muscular dystrophies. *Skelet Muscle* 2011; 1: 24.
9. **Sanes JR.** The Basement Membrane/Basal Lamina of Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 2003; 278: 12601-12604.
10. **Alexander M, Casar J, Motohashi N, Myers J, Eisenberg I, Gonzalez R, et al.** Regulation of DMD pathology by an ankyrin-encoded miRNA. *Skelet Muscle* 2011; 1: 27.
11. **QIAGEN.** Muscular Dystrophies and Dystrophin-Glycoprotein Complex. © 2009. Disponible: <https://www.qiagen.com/co/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details.aspx?pwid=308>.
12. **Han R.** Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. *Skeletal Muscle* 2011; 1: 10.
13. **Waddell LB, Lemckert FA, Zheng XF, Tran J, Evesson FJ, Hawkes JM, et al.** Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 70: 302-313.
14. **Milisenda JC, Selva-O'Callaghan A, Grau JM.** The diagnosis and classification of polymyositis. *J Autoimmun* 2014; 48-49: 118-121.
15. **Huijing PA.** Muscle as a collagen fiber reinforced composite: a review of force transmission in muscle and whole limb. *J Biomech* 1999; 32: 329-345.
16. **Purslow PP.** Muscle fascia and force transmission. *J Bodyw Mov Ther* 2010; 14: 411-417.
17. **Zhang C, Gao Y.** The role of transmembrane proteins on force transmission in skeletal muscle. *J Biomech* 2014; 47: 3232-3236.
18. **Scott W, Stevens J, Binder-Macleod S.** Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Phys Ther* 2001; 81: 1810-1816.
19. **Vivo J, Morales JL, Diz A, Miró F, Galisteo AM, Agüera E.** Morphologic and morphometric study of the *musculus obliquus dorsalis* of the dog. *Arch Med Vet* 2004; 37: 49-54.
20. **Hebling A, Esquisatto M, Castro LH.** Estudio Histoquímico de la Enzima NADH-TR en Músculo Frontal de Conejos Norfolk (*Oryctolagus cuniculus*). *Int J Morphol* 2006; 24: 151-154.
21. **Carmo-Araujo EM, Dal-Pai-Silva M, Dal-Pai V, Cecchini R, Anjos Ferreira AL.** Ischaemia

- and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies. *Int J Exp Path* 2007; 88: 147-154.
22. De Freitas CEA, Freitas SBZ, Lopes FS, Pai-Silva MD, Picarco IC. Skeletal muscles with antagonistic muscular actions: morphological, contractile and metabolic characteristics. *Int J Morphol* 2009; 27: 1173-1178.
 23. Cornachione AS, Cação-Benedini LO, Chessa DL, Martinez EZ, Mattiello-Sverzut AC. Effects of eccentric exercise in rehabilitation of phasic and tonic muscles after leg immobilization in rats. *Acta Histochem* 2014; 116: 1216-1224.
 24. Lexell J, Jarvis JC, Currie J, Downham DY, Salmons S. Fibre type composition of rabbit tibialis anterior and extensor digitorum longus muscles. *J Anat* 1994; 185: 95-101.
 25. Soukup T, Zacharová G, Smerdu V. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem* 2002; 104: 399-405.
 26. Graziotti GH, Rios CM, Rodríguez JM, Salinas MA, Bosco A, Paltenghi A, et al. Muscular partitioning in the semitendinosus muscle of the pig. *Int J Morphol* 2009; 27: 947-953.
 27. Wallace GQ, McNally EM. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* 2009; 71: 37-57.
 28. Barohn RJ, Dimachkie MM, Jackson CE. A pattern recognition approach to patients with a suspected myopathy. *Neurol Clin* 2014; 32: 569-593, vii.
 29. McNally EM, Pytel P. Muscle diseases: the muscular dystrophies. *Annu Rev Pathol* 2007; 2: 87-109.
 30. Tsujino S, Nonaka I, DiMauro S. Glycogen storage myopathies. *Neurol Clin* 2000; 18: 125-150.
 31. Dalakas MC. Review: An update on inflammatory and autoimmune myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37: 226-242.
 32. Nava A, Orozco-Barocio G. Abordaje en el diagnóstico diferencial de las miopatías inflamatorias. *Reumatol Clin* 2009; 5: 32-34.
 33. Vela Souto A. Protocolo diagnóstico del paciente con mialgias y debilidad muscular. *Medicine* 2011; 10: 5327-5331.
 34. Paciello O, Papparella S. Histochemical and immunohistological approach to comparative neuromuscular diseases. *Folia Histochem Cytophisiol* 2009; 47: 143-152.
 35. Carstens PO, Schmidt J. Diagnosis, pathogenesis and treatment of myositis: recent advances. *Clin Exp Immunol* 2014; 175: 349-358.
 36. Meng H, Janssen PM, Grange RW, Yang L, Beggs AH, Swanson LC, et al. Tissue Triage and Freezing for Models of Skeletal Muscle Disease. *J Vis Exp* 2014; (89): e51586.
 37. Bergmann M, Weis J, Probst-Cousin S. Muskel biopsie. *Pathologe* 2009; 30: 345-351.
 38. Lai CH, Melli G, Chang YJ, Skolasky RL, Corse AM, Wagner KR, et al. Open muscle biopsy in suspected myopathy: diagnostic yield and clinical utility. *Eur J Neurol* 2010; 17: 136-142.
 39. Ridaura-Sanz C. Biopsia muscular. *Acta Pediatr Mex* 2008; 29: 347-354.
 40. Weidenheim KM. Optimizing the Skeletal Muscle Biopsy. *Methods Mol Biol* 2014; 1180: 397-410.
 41. Siepmann T, Tesch M, Krause F, Illigens BM, Stoltenburg-Didinger G. Polymyositis with cytochrome C oxidase negative fibers-a pathological and clinical challenge. *Ann Diagn Pathol* 2013; 17: 183-186.
 42. Tavian D, Missaglia S, DiMauro S, Bruno C, Pegoraro E, Cenacchi G, et al. A late-onset case of neutral lipid storage disease with myopathy, dropped head syndrome, and peripheral nerve involvement. *J Genet Syndr Gene Ther* 2013; 4: 198.
 43. Sundaram C, Meena AK, Uppin MS, Govindaraj P, Vanniarajan A, Thangaraj K, et al. Contribution of muscle biopsy and genetics to the diagnosis of chronic progressive external ophthalmoplegia of mitochondrial origin. *J Clin Neurosci* 2011; 18: 535-538.
 44. Malfatti E, Nilsson J, Hedberg-Oldfors C, Hernandez-Lain A, Michel F, Dominguez-Gonzalez C, et al. A new muscle glycogen storage disease associated with glycogenin-1 deficiency. *Ann Neurol* 2014; Oct 31 [Epub ahead of print].

45. Grady JP, Campbell G, Ratnaike T, Blakely EL, Falkous G, Nesbitt V, et al. Disease progression in patients with single, large-scale mitochondrial DNA deletions. *Brain* 2014; 137: 323-334.
46. Blakely EL, Yarham JW, Alston CL, Craig K, Poulton J, Brierley C, et al. Pathogenic mitochondrial tRNA point mutations: nine novel mutations affirm their importance as a cause of mitochondrial disease. *Hum Mutat* 2013; 34: 1260-1268.
47. Pronicki M, Matyja E, Piekutowska-Abramczuk D, Szymanska-Debinska T, Karkucska-Wieckowska A, Karczmarewicz E, et al. Light and electron microscopy characteristics of the muscle of patients with SURF1 gene mutations associated with Leigh disease. *J Clin Pathol* 2008; 61: 460-466.
48. Wallgren-Pettersson C. Nemaline and myotubular myopathies. *Semin Pediatr Neurol* 2002; 9: 132-144.
49. Feeney EJ, Austin S, Chien YH, Mandel H, Schoser B, Prater S, et al. The value of muscle biopsies in Pompe disease: identifying lipofuscin inclusions in juvenile- and adult-onset patients. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2: 2.
50. Larsson NG, Oldfors A. Mitochondrial myopathies. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 385-393.
51. Latorre R, Gil F, Vasquez J. Skeletal muscle fiber types in the dog. *J Anat* 1993; 182: 329-337.
52. Kim JY, Jeong EH, Park KD, Koo H. Myofibrillar Myopathy-A Case Report. *Korean Journal of Pathology* 2010; 44: 426-430.
53. North KN, Wang CH, Clarke N, Jungbluth H, Vainzof M, Dowling JJ, et al. Approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Neuromuscul Disord* 2014; 24: 97-116.
54. Nakatani T, Nakashima T, Kita T, Hirofuji C, Itoh K, Ishihara A. Succinate Dehydrogenase Activities of Fibers in the Rat Extensor Digitorum Longus, Soleus, and Cardiac Muscles. *Arch Histol Cytol* 1999; 62: 393-399.
55. Reimann J, Kunz WS, Vielhaber S, Kappes-Horn K, Schröder R. Mitochondrial dysfunction in myofibrillar myopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003; 29: 45-51.
56. Wani AA, Rangrez AY, Kumar H, Bapat SA, Suresh CG, Barnabas S, et al. Analysis of reactive oxygen species and antioxidant defences in complex I deficient patients revealed a specific increase in superoxide dismutase activity. *Free Radic Res* 2008; 42: 415-427.
57. Reichmann H. Enzyme activity analyses along ragged-red and normal single muscle fibres. *Histochemistry* 1992; 98: 131-134.
58. Van Hoove J, Freehauf C, Miyamoto S, Vladutiu GD, Pancrudo J, Bonilla E, et al. Infantile cardiomyopathy caused by the T14709C mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene. *Eur J Pediatr* 2008; 167: 771-776.
59. van Adel BA, Tarnopolsky MA. Metabolic myopathies: update 2009. *J Clin Neuromuscul Dis* 2009; 10: 97-121.
60. Cherin P. Polimiositis y dermatomiositis. *EMC - Aparato Locomotor* 2003; 36: 1-11.
61. Bönnemann CG, Wang CH, Quijano-Roy S, Deconinck N, Bertini E, Ferreiro A, et al. Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 2014; 24: 289-311.
62. Rodríguez Cruz PM, Luo YB, Miller J, Junckerstorff RC, Mastaglia FL, Fabian V. An analysis of the sensitivity and specificity of MHC-I and MHC-II immunohistochemical staining in muscle biopsies for the diagnosis of inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord* 2014; Jun 30 [Epub ahead of print].
63. Lang T, Laver N, Strominger MB, Witking A, Pfannl R, Alroy J. Morphological findings of extraocular myopathy with chronic progressive external ophthalmoplegia. *Ultrastruct Pathol* 2010; 34: 78-81.
64. Goebel HH, Stenzel W. Practical Application of Electron Microscopy to Neuromuscular Diseases. *Ultrastruct Pathol* 2013; 37: 15-18.