



Técnicas de inmunohistoquímica

EL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS MIOPATÍAS MUSCULARES PRIMARIAS PROGRESIVAS (DISTROFIAS MUSCULARES)

M.A. Idoate Gastearena y A. Panizo Santos

Departamento de Anatomía Patológica, Clínica Universitaria, Universidad de Navarra, Pamplona.

Las miopatías musculares progresivas o distrofias musculares componen un heterogéneo grupo de enfermedades primitivas musculares que tienen en común la transmisión hereditaria y el patrón histopatológico miopático (1). La mayoría se transmiten mediante una herencia autosómica recesiva, aunque el grupo denominado distrofinopatías primarias lo hacen por transmisión ligada al cromosoma X.

El patrón histopatológico miopático es un patrón lesional muscular característico consistente en cambios en las fibras musculares y en el intersticio. Los primeros son variables y consisten en degeneración celular, del tipo de vacuolización e hipereosinofilia, aspecto hialino de las fibras, presencia de bandas de contracción muscular, atrofia redondeada y necrosis, que alterna con fenómenos de regeneración e hipertrofia celular. Histoenzimáticamente se observa un predominio de fibras tipo I. Como consecuencia de la regeneración muscular el diámetro de la fibra muscular es muy variable. Los cambios intersticiales son más o menos acusados y consisten en fibrosis, infiltración grasa e inflamación predominantemente linfocitaria, aunque puede producirse infiltración macrofágica en relación con fibras musculares necróticas (Fig. 1).

El mejor conocimiento de las estructuras de anclaje de las fibras musculares esqueléticas ha mostrado que este sistema está dotado de una gran complejidad (Tabla 1). El estudio de esta red de proteínas es objeto de una intensa investigación biológica (2). De esta manera, tras la identificación de las proteínas ha sido posible explicar la alteración molecular subyacente y diferenciar mejor el grupo de las distrofias musculares.

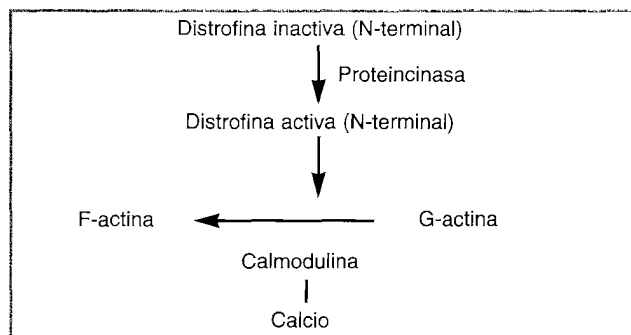


Figura 6. Mecanismo de acción de la distrofina.

bre, este grupo de enfermedades pueden debutar en el adulto. La alteración puede estar asociada a una elevación de la creatinina sérica.

De todas las GAD la más importante es el déficit muscular de alfa sarcoglicano, ya que su ausencia es la causa de una de las más frecuentes distrofias musculares autosómicas recesivas de la infancia que se conoce con el nombre de adhalinopatía (24). Existen cuatro formas clínicas de la enfermedad de acuerdo con la gravedad del proceso. La afección se produce como consecuencia de un déficit en el alfa sarcoglicano, proteína de 50 kD (25, 26). La pérdida

de la adhalina se puede producir por mutación (27). El estudio inmunohistoquímico permite la detección de su ausencia, así como la preservación de otras proteínas como la distrofina y la laminina (28). Como en el caso de las distrofinopatías primarias, la intensidad de inmunorreactividad refleja el grado de déficit proteico y la gravedad de la enfermedad (29).

La laminina muscular, laminina tipo 2 o merosina es un componente fundamental de la membrana basal de la fibra muscular. La merosina está formada por tres cadenas: alfa-2, beta-1 y gamma-1. La pérdida de merosina puede observarse en dos condiciones: pérdida de la proteína en las distrofias musculares de la infancia por ausencia de merosina o verdaderas merosinopatías primarias, o alteración de la expresión de la laminina tipo 2 en los pacientes gravemente afectados de déficit de alfa sarcoglicano (30).

Las mutaciones en el gen localizado en el cromosoma 6 (6q22-23) se asocian con una hipotonía grave, contracturas articulares ya en el nacimiento y un aumento de la creatinquinasa sérica durante los primeros meses de la vida. Además, se producen alteraciones en la sustancia blanca hemisférica detectadas como áreas hiperintensas en la resonancia magnética nuclear (31).

Otras proteínas cuya alteración es causa de enfermedad muscular son:

- La alfa-actinina: es una proteína del citoesqueleto, localizada en la banda Z, que establece puentes con la F-actina. Se halla alterada en la miopatía nemalínica congénita. Cursa con debilidad muscular generalizada e hipotonía desde el nacimiento, escoliosis y contracturas. Puede detectarse mediante inmunohistoquímica.
- La emerina: es una proteína rica en serina de 34 kD, ubicada, con mayor concentración en el músculo. Se localiza en la membrana nuclear. Su deficiencia es causa de la enfermedad conocida como distrofia muscular de Emery-Dreifuss. Se trata de una enfermedad muscular recesiva ligada al sexo (Xq28), que se manifiesta por una afectación predominante escápulo-humeral y el desarrollo de contracturas.
- La miosina: es una proteína contráctil de la fibra muscular. Consta de dos cadenas pesadas y cuatro ligeras. Está alterada en la regeneración de fibras musculares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dubowitz V. *The muscular dystrophies*. En: *Muscle disorders in childhood*. WB Saunders Co., 2ª ed., capítulo 2. Londres 1995.
2. Ervasti JM, Campbell KP. *Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex*. Cell 1991; 1121-1131.
3. Wakayama Y, Jimi T, Takeda A y cols. *Immunoelectron microscopic localization of C-terminus of 43-kDa dystrophin-associated glycoprotein in normal human skeletal myofibers*. J Electron Microsc Tokyo 1994; 43: 327-331.
4. Stromer MH. *Immunocytochemistry of the muscle cell cytoskeleton*. Microsc Res Tech 1995; 31: 95-105.
5. Ahn AH, Kunkel LM. *The structural and functional diversity of dystrophin*. Nature Genetics 1993; 3: 283-291.
6. Ljunggren A, Duggan D, McNally E y cols. *Primary adhalin deficiency as a cause of muscular dystrophy in patients with normal dystrophin*. Ann Neurol 1995; 38: 367-372.
7. Bittner RE, Shorny S, Ferlinger R y cols. *Sarcolemmal expression of dystrophin C-terminus but reduced expression of 6q-dystrophin-related protein in two DMD patients with large deletions of the dystrophin gene*. Neuromuscul Disord 1995; 5: 81-92.

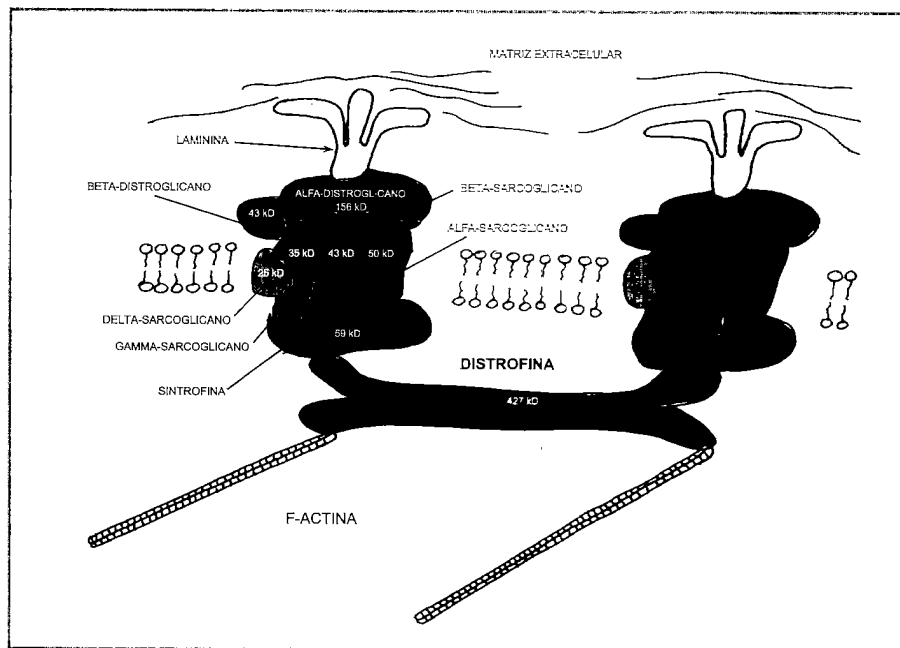


Figura 2. Dibujo esquemático del sistema de anclaje del sarcolema a la membrana basal y al citoesqueleto.

distrofinopatías son las más frecuentes de las distrofias musculares, de tal manera que en torno a la mitad de los casos con distrofia muscular de la infancia presentan una distrofinopatía primaria (6). Se incluyen entre ellas la enfermedad de Duchenne y la de Becker.

El estudio inmunohistoquímico junto con el análisis molecular de la proteína mediante *Western-blot* son fundamentales para el diagnóstico de la enfermedad. La ausencia de distrofina en el *Western-blot* es diagnóstica de la forma grave de la enfermedad de Duchenne. La detección de una proteína de tamaño menor del normal es indicativa de enfermedad de Becker o de formas más leves de Duchenne. Ocasionalmente, en la enfermedad de Becker puede producirse una proteína de menor tamaño, pero funcional. La delección parcial de la proteína, aun siendo importante, puede ser compatible con una proteína funcional (7).

Los patrones de inmunorreactividad observados en los enfermos afectados de distrofinopatía primaria pueden ser de tres tipos:

- Patrón negativo o de ausencia total de inmunorreactividad, propio de la enfermedad de Duchenne (Fig. 4A).
- Patrón en mosaico o de coexistencia de fibras positivas y negativas, que puede observarse tanto en la enfermedad de Duchenne como en la de Becker (Fig. 4B).
- Patrón discontinuo o de solución de continuidad en la inmunorreactividad de membrana, propio de la enfermedad de Becker (Fig. 5).

En la enfermedad de Becker se aprecia en general una mayor intensidad y densidad de fibras positivas que en la de Duchenne. Aunque la valoración de la intensidad de inmunotinción es ciertamente subjetiva, en la enfermedad de Becker pueden apreciarse variaciones de la intensidad de tinción en diferentes fibras musculares. Por otra parte, en la enfermedad de Becker no se produce el patrón negativo de inmunorreactividad.

El patrón en mosaico de las distrofinopatías primarias tiene un gran interés biológico. Se trata de una verdadera conservación estructural y funcional de la distrofina detectada mediante inmunohistoquímica. Se ha demostrado mediante PCR que las fibras musculares inmunorreactivas no presentan delección para el gen

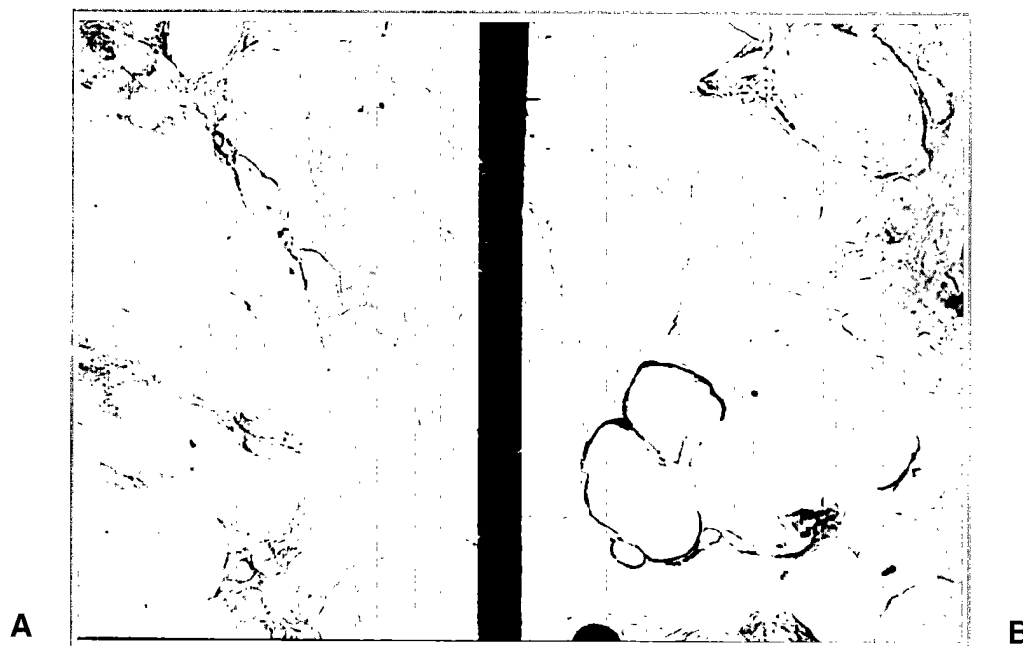


Figura 4. Dos patrones de inmunorreactividad en la enfermedad de Duchenne. A: patrón negativo o de ausencia total de inmunorreactividad frente a la distrofina (original, ABC $\times 200$). B: patrón en mosaico o de fibras positivas aisladas (original, ABC $\times 200$).

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que la desaparición focal de la distrofina no es sinónimo de distrofinopatía ya que ésta puede perderse temporalmente en las fibras degeneradas y en estadios precoces de la regeneración (20).

El grupo de las GAD está compuesto por glucoproteínas de diferente peso molecular que establecen una estrecha conexión entre sí y con la distrofina. Se distinguen tres tipos: las pertenecientes al complejo del sarcoglicano, las integrantes del complejo del distroglicano y las que conforman el grupo de las sintrofinas (21). Dentro del complejo del sarcoglicano se distinguen cuatro proteínas: alfa, beta, gamma y delta sarcoglicano. A su vez, dentro del complejo del distroglicano se diferencian dos proteínas: alfa y beta distroglicano. Finalmente, el grupo de las sintrofinas está integrado por la alfa sintrofina, la beta-1 sintrofina y la beta-2 sintrofina (22).

Las alteraciones moleculares de las GAD son la base de un grupo de miopatías musculares progresivas de gran interés conocidas como distrofias musculares autosómicas recesivas graves de la infancia o distrofias tipo cinturas de la infancia (23). Constituyen un grupo heterogéneo de procesos raros que tienen en común el patrón histopatológico miopático y el tipo de herencia. A pesar del nom-



Figura 5. Patrón discontinuo en la enfermedad de Becker. Se aprecian áreas de desaparición de la inmunorreactividad frente a la distrofina (original, ABC $\times 400$).

membrana de la célula. Ésta es una proteína de membrana que puede detectarse mediante inmunohistoquímica, codificada por el gen *MDR-1*.

Lectinas

Son proteínas obtenidas de plantas que se unen específicamente a carbohidratos. Se han empleado en el estudio de las modificaciones de los glucoconjugados celulares, fundamentalmente en las neoplasias, ya que parecen tener una relación con su comportamiento y poder metastásico.

Marcadores de proliferación

La valoración del porcentaje de células proliferantes en una neoformación se puede realizar mediante citometría de flujo, empleando inmunohistoquímica con anticuerpos frente a diferentes proteínas expresadas durante el ciclo celular, y mediante la incorporación *in vivo* o *in vitro* de bromodeoxiuridina nucleótida sintética (BrdU) al DNA que luego puede ser detectada mediante inmunohistoquímica.

Receptores hormonales

La actividad y el crecimiento de algunos órganos y tejidos es controlado por hormonas que actúan sobre recep-

tores específicos situados en sus respectivos órganos diana. La detección de estos receptores puede realizarse mediante técnicas bioquímicas y técnicas de inmunohistoquímica, al haberse desarrollado anticuerpos frente a receptores de estrógenos, receptores de progesterona y receptores de andrógenos.

Solución de desenmascaramiento

Tampón donde se sumergen las preparaciones durante el proceso de desenmascaramiento por calor para evitar su secado. Pueden ser muy variadas: agua destilada, Tris, EDTA, urea, cloruro sódico, cloruro magnésico, TUF, etc., y a diferentes pH y molaridades. Aunque no existe un tampón ideal, parece que el citrato sódico es la mejor solución de desenmascaramiento. Los factores clave para obtener los mejores resultados de inmunorreactividad son el pH y la molaridad del tampón empleado.

Ulex Europaeus Agglutinin

Es una lectina que se une específicamente a los compuestos glucídicos que contienen α -L-fucosa. Como los proteoglucanos de las células endoteliales humanas contienen residuos de fucosa, esta lectina es un buen marcador del endotelio humano.

8. Uchino M, Tokunaga M, Mita S y cols. *PCR and immunocytochemical analysis of dystrophin-positive fibers in Duchenne muscular dystrophy*. J Neurol Sci 1995; 129: 44-50.
9. Saito K, Ikeya K, Kondo E y cols. *Somatic mosaicism for a DMD gene deletion*. Am J Med Genet 1995; 56: 80-86.
10. Nicholson LVB, Johnson MA, Gardner-Medwin D y cols. *Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy*. Acta Neuropathol (Berlin) 1990; 80: 239-250.
11. Fanin M, Danieli GA, Cadaldini M y cols. *Dystrophin-positive fibers in Duchenne dystrophy: Origin and correlation to clinical course*. Muscle Nerve 1995; 18: 1115-1120.
12. Fabbriozio E, Bonet-Kerrache A, Limas F y cols. *Dystrophin, the protein that promotes membrane resistance*. Biochem Biophys Res Commun 1995; 21: 295-301.
13. Jarrett HW, Foster JL. *Alternate binding of actin and calmodulin to multiple sites on dystrophin*. J Biol Chem 1995; 270: 5578-5586.
14. Nonaka I. *Muscle pathologic diagnosis mechanism in muscle fiber degeneration*. Rinsho Shinkeigaku 1994; 34: 1279-1281.
15. Lindahl M, Backman E, Henriksson KG y cols. *Phospholipase A2 activity in dystrophinopathies*. Neuromuscul Disord 1995; 5: 193-199.
16. Kumamoto T, Ueyama H, Watanabe S y cols. *Immunohistochemical study of calpain and its endogenous inhibitor in the skeletal muscle of muscular dystrophy*. Acta Neuropathol Berl 1995; 89: 399-403.
17. Tidball JG, Albrecht DE, Lokensgard BE, Spencer MJ. *Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle*. J Cell Sci 1995; 108: 2197-2204.
18. Sewry CA, Matsumara K, Campbell KP, Dubowitz V. *Expression of dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in carriers of Duchenne muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord 1994; 4: 401-409.
19. Arahata K, Hatashi YK, Mizuno Y y cols. *Preservation of the C-terminus of dystrophin molecule in the skeletal muscle from Becker muscular dystrophy*. J Neurol Sci 1991; 101: 148-156.
20. Vater R, Harris JB, Anderson VB y cols. *The expression of dystrophin-associated glycoproteins during skeletal muscle degeneration and regeneration. An immunofluorescence study*. J Neuropathol Exp Neurol 1995; 54: 557-569.
21. Yang B, Jung D, Rafael JA y cols. *Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin*. J Biol Chem 1995; 270: 4975-4978.
22. Lefebvre S, Bueglen L, Reboullet S y cols. *Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene*. Cell 1995; 80: 155-165.
23. Benamida M, Fardo M, Attia N. *Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia*. Muscle and Nerve 1993; 6: 469-480.
24. Azibi K, Bacher L, Beckman JS. *Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficit of 50 kD dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12*. Hum Mol Genet 1993; 2: 1423-1428.
25. Hayashi YK, Mizuno Y, Yoshida M y cols. *The frequency of patients with 50 kD dystrophin associated glycoprotein (50 DAG or adhalin) deficiency in a muscular dystrophy patient population in Japan: Immunocytochemical analysis of 50 DAG, 43 DAG, dystrophin and utrophin*. Neurology 1995; 45: 551-554.
26. Matsumara K, Tomé F, Collin H y cols. *Deficiency of the 50 kD dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy*. Nature 1992; 359: 320-322.
27. Roberds S, Leturc F, Allamand V y cols. *Missense mutation in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy*. Cell 1994; 78: 624-633.
28. Yamanouchi Y, Arikawa E, Arahata K y cols. *Limb-girdle muscular dystrophy: Clinical and pathological reevaluation*. J Neurol Sci 1995; 129: 15-20.
29. Piccolo R, Roberds SL, Jeanpierre M, Leturcq F y cols. *Primary adhalinopathy: A common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity*. Nat Genet 1995; 10: 243-245.
30. Yamada H, Tomé FM, Higuchi I y cols. *Laminin abnormality in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy*. Lab Invest 1995; 72: 715-722.
31. Mendell JR, Sahenk Z, Prior TW. *The childhood muscular dystrophies: Diseases sharing a common pathogenesis of membrane instability*. J Child Neurol 1995; 10: 150-159.

nes la hacen difícil de aplicar rutinariamente en un laboratorio de anatomía patológica, ya que es laboriosa y requiere una gran cantidad de tejido fresco para alcanzar un adecuado grado de sensibilidad. Es por ello por lo que en nuestra especialidad las dos técnicas que más se han utilizado son la hibridación *in situ* y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta última, por su sensibilidad y especificidad, se ha convertido en la técnica más ampliamente desarrollada. No obstante, en cuanto a su sensibilidad, hay que tener en cuenta dos limitaciones importantes: la calidad del DNA en las muestras y el método utilizado para la detección del producto amplificado.

La mayor parte de los estudios rutinarios en nuestros laboratorios se llevan a cabo sobre material fijado e incluido en parafina. La cantidad y calidad del DNA extraído depende del tipo de tejido, el fijador utilizado, la duración de la fijación y la duración y tipo de almacenamiento de los bloques. En cuanto a la detección de productos de PCR, el método más simple y frecuentemente usado es su visualización directa en geles de agarosa o poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio y expuestos a luz ultravioleta. Este método, sin embargo, es relativamente poco sensible en determinadas circunstancias. La hibridación del producto de PCR transferido a membranas, con sondas radiactivas o no, si bien aumenta notablemente la sensibilidad, incrementa el tiempo y la complejidad del proceso.

En cuanto a la especificidad de la técnica, el riesgo de falsos positivos debido a la contaminación de muestras negativas con DNA de muestras positivas (o, lo que es más común, con productos de amplificaciones positivas previas) es una de las limitaciones más importantes de la aplicación rutinaria de la técnica de PCR al diagnóstico clínico. Junto a las medidas generales de laboratorio para evitar las contaminaciones, el uso de controles negativos en todos los estudios es una medida indispensable.

El interés del patólogo en la detección y tipificación de microorganismos patógenos no queda restringido exclusivamente al campo de la afección, sino que se extiende al de la neoplasia debido al cada vez más amplio grupo de tumores en cuya génesis intervienen los agentes infecciosos. Este artículo no es una revisión exhaustiva de las aplicaciones del análisis de ácidos nucleicos al campo de la patología infecciosa o neoplásica en anatomía patológica, sino que intenta presentar algunos de los ejemplos que pueden ser de más utilidad al patólogo en su práctica diaria, incluyendo algunos detalles técnicos en el Anexo.

MICOBACTERIOSIS

El diagnóstico de infección por *Mycobacterium tuberculosis* es uno de los más difíciles de establecer dentro de las infecciones bacterianas. La identificación de las distintas especies de micobacterias se realiza tradicionalmente mediante cultivo y ensayos bioquímicos que requieren varias semanas desde la recepción de la muestra. En concreto, son necesarias hasta 8 semanas de cultivo para la identificación de *M. tuberculosis*. Desde que comenzó la pandemia de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el diagnóstico de la tuberculosis se ha dificultado, además, por las presentaciones atípicas de la enfermedad y la gran incidencia de afección producida por micobacterias no tuberculosas. Por ello, en los últimos años ha habido una demanda creciente de disponer de métodos de diagnóstico rápidos y fiables que permitan reducir el riesgo de brotes epidémicos de tuberculosis multirresistente (3).

La identificación directa de los bacilos ácido-alcohol resistentes en las secciones tisulares, aunque rápida, es de baja sensibilidad, ya que requiere una gran cantidad de microorganismos (10^4 /ml). Además, la tinción directa es inespecífica, ya que no permite diferenciar las distintas especies de micobacterias, lo que es de especial importancia en pacientes VIH+. La PCR posee una gran sensibilidad en el diagnóstico de micobacteriosis, y dependiendo de la estrategia utilizada permite el diagnóstico específico de distintas especies de micobacterias, incluida la tuberculosa.

Diferentes genes de *M. tuberculosis* se han utilizado como diana de amplificación en reacciones de PCR. Entre ellas destacan:

- El gen que codifica la proteína de 38 kDa (antígeno b) (3), un gen específico de *M. tuberculosis* presente en una sola copia en su genoma.
- La secuencia de inserción IS6110 (4), una secuencia repetida entre 1 y 24 veces en las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (Fig. 1A).
- El gen *hsp65* (5-8), muy conservado entre las distintas especies de micobacterias, que codifica la proteína de choque térmico de 65 kDa (Fig. 1B-D).
- Secuencias del DNA que codifican el RNAr 16s (9). También se utiliza la detección del RNAr 16S de *M. tuberculosis* mediante RT-PCR. Aunque este RNAr es muy abundante —lo que facilita su detección—, la necesidad de disponer de material en fresco para la extracción de RNA y su posterior transcripción inversa para la síntesis de DNAc y amplificación del mismo dificulta su uso rutinario.