

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO  
CARRERA DE TECNOLOGIA MÉDICA

## **“ESTANDARIZACION DE LA TECNICA TRICROMICA DE GOMORI MODIFICADA PARA MUSCULO”**

"TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO EN CONFORMIDAD A LOS  
REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE “LICENCIADO EN  
TECNOLOGÍA MÉDICA CON MENCIÓN EN MORFOFISIOPATOLOGÍA Y  
CITODIAGNÓSTICO”

SILVANA A. TOLEDO ABARCA.

Profesor Guía: Luis Silva Risopatrón.  
Profesor Co Guía: Jimena Le Roy

2006

## RESUMEN

La Técnica Tricrómica de Gomori Modificada es una técnica para biopsias musculares en congelación. La técnica original fue creada por Gomori y se le conoce como “técnica de un paso”, la cual fue concebida para biopsias musculares fijadas en formalina e incluidas en parafina, dando una tinción diferencial entre músculo y fibras colágenas. En 1963, Engel & Cunningham realizaron la adaptación de esta técnica para biopsias musculares en congelación y cuya nueva característica era la de teñir las fibras musculares de color verde azulado y las mitocondrias rojizas. Quien popularizó esta nueva técnica fue el doctor Víctor Dubowitz, neurólogo inglés que en la década de los 60 popularizó el uso de técnicas histoquímicas para biopsias musculares; él mostró la utilidad de esta técnica como apoyo diagnóstico principalmente para miopatías mitocondriales, así como de otras patologías musculares (miopatías nemalínicas y miositis con cuerpo de inclusión), ya que siendo una técnica no enzimática logra una coloración diferencial entre las fibras musculares normales (verde-azulado) y las afectadas (rojas). Desde entonces la técnica ha sido empleada como apoyo diagnóstico en los laboratorios de anatomía patológica y de investigación.

Existen ciertos inconvenientes en la utilización de esta técnica que radican en ciertos aspectos de la coloración que no son reproducibles. Uno de ellos es el color que adquieren las fibras musculares, el cual puede variar del verde al azul. Y el otro inconveniente es la aparición de sectores de fibras musculares de coloración rojiza y de distribución anormal, pese a ser realizados en músculos normales o con afecciones que no tienen relación con esa coloración.

En este trabajo se realizaron diversas pruebas para estandarizar la técnica y lograr resultados reproducibles y óptimos, realizando variaciones en el protocolo que incluyen cambios en factores como el pH, la concentración de ácido acético y el uso de muestras fijadas en formol buffer e incluidas en parafina y otras congeladas sin fijar.

Los resultados obtenidos demuestran que la coloración de las fibras musculares de las muestras fijadas en formol buffer e incluidas en parafina se ven afectadas por el pH, y que las muestras en congelación y cortadas al criostato se ven afectadas en un grado menor. La concentración del ácido acético parece no tener mayor influencia en la tonalidad y distribución del color en las fibras musculares. En las biopsias musculares fijadas en formalina e incluidas en parafina, la coloración rojiza de algunas fibras musculares y ciertas alteraciones morfológicas, no atribuibles a alguna patología, se debe a factores externos al protocolo de la técnica. La principal causa probable de estas alteraciones es la inadecuada manipulación de la muestra, lo cual al producir distorsiones en la arquitectura interna del miocito generarían alteraciones de las reacciones histoquímicas. En el caso de las biopsias en congelación, puede atribuirse además de una mala manipulación, a la congelación inadecuada que produce formaciones de cristales en las fibras, lo cual alteraría también la reacción histoquímica.

Palabras clave: técnica – Gomori - músculo - mitocondrias - histoquímica – miopatía





## CAPITULO 7: CONCLUSIONES

### REFERENCIAS

Libros

Publicaciones

Paginas Web

**¡Error! Marcador no definido.**

**¡Error! Marcador no definido.**

**¡Error! Marcador no definido.**

**¡Error! Marcador no definido.**

**¡Error! Marcador no definido.**

# **CAPITULO 1: INTRODUCCION**

## **1.1. Antecedentes y motivación**

Como todo protocolo de técnica, existen ciertos inconvenientes a nivel de calidad de tinción. Si bien es cierto este estudio no tiene como finalidad disminuir los costos de la técnica, si supone una mejora cualitativa para promover y estimular su uso en laboratorios de Anatomía Patológica y de investigación.

El uso de la Técnica Tricrómica de Gomori Modificada se utiliza como herramienta de apoyo para el diagnóstico de diversas patologías musculares. Sin embargo, en nuestro país parece ser poco utilizada. Este es uno de los motivos por los cuales se busca indagar mas sobre éste tema. En general existe escasa información al respecto. En libros de patología se la menciona en las secciones de patología muscular principalmente y no se da mayor información sobre la técnica. La bibliografía sobre técnicas de histotecnología también es escasa, por lo cual se deduce que no hay un estudio profundo del caso. Las referencias de revistas electrónicas tampoco son muy variadas sobre esta materia y los pocos que la mencionan, se refieren principalmente al uso de la técnica como una más dentro de su metodología.

En la actualidad se cuenta con pruebas de alta especificidad y sensibilidad para resolver problemas diagnósticos, pero que son muy costosos y en nuestro país no pueden realizarse popularmente. Es por eso que vale la pena rescatar las técnicas histoquímicas y situarlas como útiles herramientas en nuestro contexto como país.

## **1.2. Descripción del problema**

La Técnica Tricrómica de Gomori Modificada es una técnica histológica para biopsias neuromusculares. Tiene en su composición cromótopo 2R, diagnóstico fosfotúngstico, Fast Green, diagnóstico acético glacial y Hematoxilina de Harris. Se usa para secciones de biopsias musculares. Tiñe los núcleos rojo púrpura, las miofibrillas musculares normales verde azulado, el colágeno color verde turquesa, los núcleos, la mielina y glóbulos rojos se colorean de rojo. Es muy útil para demostrar miopatías mitocondriales y para la investigación.

Se busca optimizar la técnica para obtener resultados reproducibles en cuanto a la distribución del color y demostrar su utilidad no solo para cortes en congelación si no también para biopsias fijadas en parafina. Podría haber un defecto en el protocolo que resulta en una tinción con distribución de colores no esperada. Los resultados obtenidos en el laboratorio anteriormente arrojan estos resultados. Estos resultados no esperados son una mala distribución del color y tonalidad en las fibras musculares. Se obtienen coloraciones rojizas en vez de verde-azulado de distribución irregular y aleatoria y la distribución del color verde muchas veces no es adecuada. Este hecho es relevante en cuanto a que el principal uso de esta técnica es para diferenciar ciertas patologías según la coloración de las miofibrillas.

## CAPITULO 1: INTRODUCCION

### **1.3. Solución propuesta**

Por medio de diversas pruebas de laboratorio realizadas en biopsias musculares se espera comprender mejor esta técnica, optimizar los resultados obtenidos y analizar los resultados en biopsias musculares fijadas en formalina e incluidas en parafina. El departamento de anatomía patológica se beneficiaría de ésta optimización de la técnica que, pese a ser poco utilizada, entrega evidencias importantes en ciertas patologías musculares.

### **1.4. Objetivos**

#### **1.4.1.- Objetivo general**

Estandarizar Técnica Tricrómica de Gomori Modificada.

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Optimizar la técnica Técnica Tricrómica de Gomori Modificada para lograr resultados reproducibles.
- Utilizar la técnica en biopsias musculares fijadas e incluidas en formalina.
- Comprender las razones de los resultados no reproducibles.
- Incentivar su uso en los laboratorios.
- Demostrar sus beneficios para el diagnóstico como para la investigación.

### **1.5. Metodologías y herramientas utilizadas**

Se recolectó 16 biopsias musculares fijadas en formol buffer e incluidas en parafina y una muestra congelada en freezer de músculo de esfínter anal. Se realizaron cortes seriados y se les realizó técnicas de rutina (Hematoxilina-Eosina y P.A.S.) y la Técnica Tricrómica de Gomori Modificada con modificaciones en su protocolo como el pH y la concentración del diagnóstico acético. Se realizaron 5 pruebas distintas variando las muestras y los factores antes mencionados.

En general el laboratorio de desarrollo del presente trabajo contaba con la infraestructura y materiales necesarios. El mayor inconveniente a ser considerado fue respecto a la obtención de muestras en congelación. En el momento de realizarse este trabajo se encontraba indisponible el método de congelación en nitrógeno líquido. Además de esto, las biopsias musculares son muy difíciles de conseguir, sobre todo las de músculo esquelético. Estos dos factores hacen que las condiciones de esta investigación que tiene referencia a las muestras en congelación no fueran óptimas.

### **1.5 Resultados obtenidos**

Se esperaba solucionar el problema de la distribución del color rojo en las fibras musculares con esta técnica al modificar los factores del protocolo mencionados en la metodología. Los resultados obtenidos en casi todas las biopsias en mayor o menor medida junto a la alteración de la morfología de éstas, hacen inferir que los factores que causan estos resultados son ajenos a la

## CAPITULO 1: INTRODUCCION

Técnica Tricrómica de Gomori Modificada, pudiendo corresponder a la manipulación previa de las muestras o posiblemente a un efecto del exceso de fijación.

En cuanto a las diferencias en las tonalidades, alteraciones en el pH conllevan un cambio en la tonalidad que adquieren las fibras musculares, siendo la óptima a pH 3.4, como lo indica el protocolo original y se descarta una influencia relevante en la mala distribución de la coloración por parte de la etapa de paso por agua acetificada al 0,2%.

Se podría realizar otras variaciones a futuro como variar el fijador utilizado, variar las concentraciones de Fast Green, ácido fosfotúngstico o cromótopo 2R, cambiar algún componente u otros cambios.

### **1.6 Organización del documento**

Este trabajo se divide en 6 capítulos.

#### **Capítulo 2: Marco teórico**

Contiene fundamentos teóricos necesarios para la comprensión del tema. Se describen brevemente el funcionamiento e histología de músculo y sus patologías relacionadas con la técnica. También se hace una reseña sobre la Técnica de Gomori, su origen, sus componentes y sus usos.

#### **Capítulo 3: Materiales y métodos**

Se describen los métodos utilizados y se enumeran los materiales necesarios para el desarrollo del trabajo.

#### **Capítulo 4: Resultados**

Acá se muestran y analizan los resultados obtenidos, según las 5 pruebas realizadas. Incluye imágenes.

#### **Capítulo 5: discusión de los resultados**

Se analizan y discuten los resultados obtenidos por medio de inferencia.

#### **Capítulo 6: conclusión**

Se plantean las deducciones realizadas de las diversas pruebas empleadas y las discusiones con base teórica de los experimentos.

# **CAPITULO 2: FUNDAMENTOS TEORICOS**

## **2.1 Músculo esquelético normal**

### **2.1.1 Electrolitos y actividad neuromuscular**

De acuerdo con [14], los nervios y las fibras musculares conservan un ambiente interno líquido, diferente del medio externo o intersticial. Los principales constituyentes intracelulares son K, Mg y P, mientras que los que se hallan en el exterior de la célula son Na, Ca, y Cl, tanto en el nervio como en el músculo las concentraciones de estos iones se mantienen dentro de los límites estrechos mediante fuerzas eléctricas y químicas que conservan las membranas en equilibrio electroquímico (potencial de membrana en reposo) estas fuerzas son resultado de la permeabilidad selectiva de las membranas a los diversos iones y de la expulsión continua de Na intracelular a través de canales especiales por un mecanismo de bomba (bomba sodio-potasio), cuya función depende de la enzima ATPasa de Na-K, que se localiza en las membranas [14].

### **2.1.2 Química de la contracción**

La contracción de una fibra muscular es una serie de sucesos electroquímicos y a la vez un suceso mecánico. El sarcolema, los túbulos transversos y el retículo sarcoplásmico desempeñan una función en el control de la actividad de las fibras musculares. Tras la estimulación nerviosa, un potencial de acción se transmite por el sarcolema desde la región de la placa motora terminal hacia ambos extremos de la fibra muscular [14].

La despolarización se extiende por prontitud hacia el interior de la fibra a lo largo de las paredes de los túbulos transversales, tal vez por un potencial de acción conducido. Los túbulos transversales y las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico entran en proximidad estrecha en los puntos referidos como triadas. Aquí la despolarización de los túbulos transversales se transmite hacia el retículo sarcoplásmico que libera el Ca almacenado en su interior. El Ca se fija a la proteína reguladora troponina y por tanto elimina la inhibición que el sistema de troponina y tropomiosina ejerce sobre la proteína contráctil activa, esto permite una interacción entre las moléculas de actina de los filamentos delgados y los puentes cruzados de las moléculas de miosina en los filamentos gruesos y facilita que la adenosin trifosfatasa de miosina (ATasa) desdoble el trifosfato de adenosina (ATP) a un ritmo rápido y por tanto proporciona la energía para contracción. Este cambio químico causa el deslizamiento de los filamentos uno sobre el otro. La relajación ocurre como resultado de la recaptura activa de Ca por el retículo sarcoplásmico [14].

Los enlaces de pirofosfato de ATP que brindan la energía para la contracción muscular deben restituirse de manera constante mediante una reacción que comprende intercambios con el fosfágeno difosfato de creatina, en la que los enlaces de fosfato de alta energía se almacenan. Estas interacciones, tanto en la contracción como en la relajación, requieren la acción de la cinasa creatina CK [14].

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

La mioglobina, otra proteína muscular importante, funciona en la transferencia del oxígeno y en dicho intercambio participan una serie de enzimas oxidativas. Las enzimas glucolíticas se utilizan en la actividad metabólica del músculo bajo condiciones anaerobias. Las fibras musculares difieren entre sí en su contenido relativo de enzimas oxidativas y glucolíticas [14].

Las fibras musculares ricas en enzimas oxidativas, llamadas Fibras tipo I, albergan más mitocondrias y grandes cantidades de mioglobina (por tanto son de color rojo). Tienen tasas de contracción y relajación más lentas, disparan de manera más tónicas y son menos fatigables que las fibras musculares deficientes en enzimas oxidativas. Las fibras tipo II ricas en enzimas glucolíticas, disparan en descargas y se usan más en las reacciones fásicas que durante las sostenidas. La magnitud de la actividad de la ATPasa de miosina que gobierna la velocidad de contracción, es baja en las fibras ricas en enzimas oxidativas (tipo I) y alta en las fibras ricas en enzimas glucolíticas (tipo II) [14].

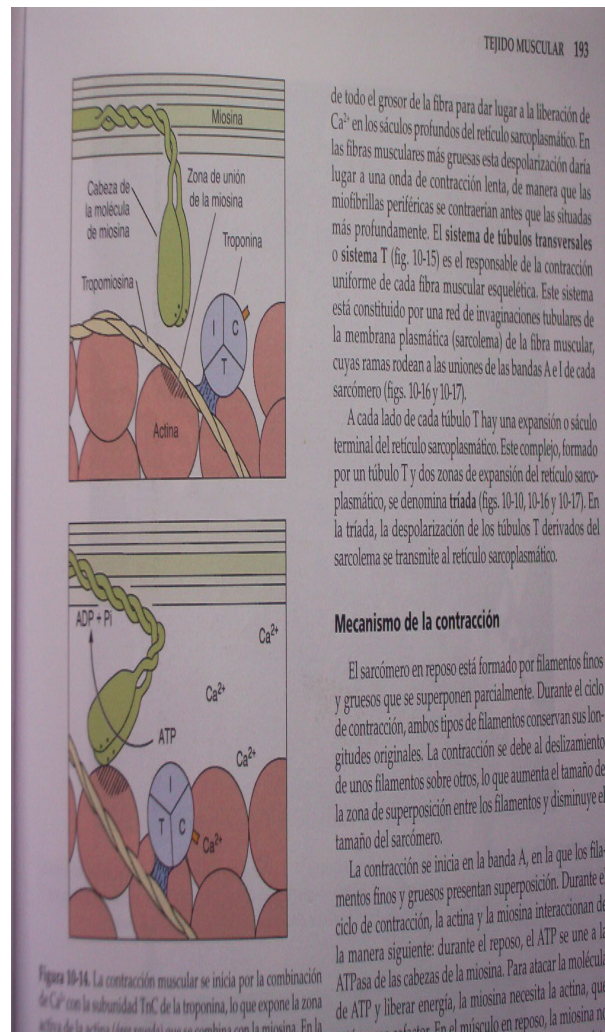
La tinción de ATPasa de miosina a pH 9.4 se emplea para identificar estos tipos de fibras en los cortes microscópicos. Las fibras tipo I tienen un contenido bajo en ATPasa de miosina y las de tipo II, ricas en enzimas fosforilativas, poseen un contenido elevado de esta enzima. De aquí que las fibras tipo I se tiñan de forma ligera y las de tipo II con mayor intensidad. La reacción inversa ocurre a un pH 4.6 [14].

La fuente más fácilmente disponible de energía es el glucógeno, que se sintetiza y almacena en las fibras musculares y provee cerca del 90 % de las necesidades energéticas del músculo bajo condiciones de trabajo intenso [14].

### **2.1.2 Histología**

El músculo estriado, el liso y el cardíaco derivan del mesodermo y se han elongado en sentido contrario a la contracción. Poseen numerosas mitocondrias para satisfacer las necesidades energéticas propias de los músculos [8]. Contienen 4 proteínas principales encargadas en la contracción: la actina, la miosina, la tropomiosina y la troponina. Estos elementos contráctiles denominadas miofilamentos. Los filamentos gruesos están formados por miosina, mientras que las otras 3 proteínas se ubican en los filamentos finos [9].

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS



de todo el grosor de la fibra para dar lugar a la liberación de  $Ca^{2+}$  en los sáculos profundos del retículo sarcoplásmico. En las fibras musculares más gruesas esta despolarización daría lugar a una onda de contracción lenta, de manera que las miofibrillas periféricas se contraerían antes que las situadas más profundamente. El sistema de túbulos transversales o sistema T (fig. 10-15) es el responsable de la contracción uniforme de cada fibra muscular esquelética. Este sistema está constituido por una red de invaginaciones tubulares de la membrana plásmica (sarcolema) de la fibra muscular, cuyas ramas rodean a las uniones de las bandas A e I de cada sarcómero (figs. 10-16 y 10-17).

A cada lado de cada túbulo T hay una expansión o sáculo terminal del retículo sarcoplásmico. Este complejo, formado por un túbulo T y dos zonas de expansión del retículo sarcoplásmico, se denomina triada (figs. 10-10, 10-16 y 10-17). En la triada, la despolarización de los túbulos T derivados del sarcolema se transmite al retículo sarcoplásmico.

#### Mecanismo de la contracción

El sarcómero en reposo está formado por filamentos finos y gruesos que se superponen parcialmente. Durante el ciclo de contracción, ambos tipos de filamentos conservan sus longitudes originales. La contracción se debe al deslizamiento de unos filamentos sobre otros, lo que aumenta el tamaño de la zona de superposición entre los filamentos y disminuye el tamaño del sarcómero.

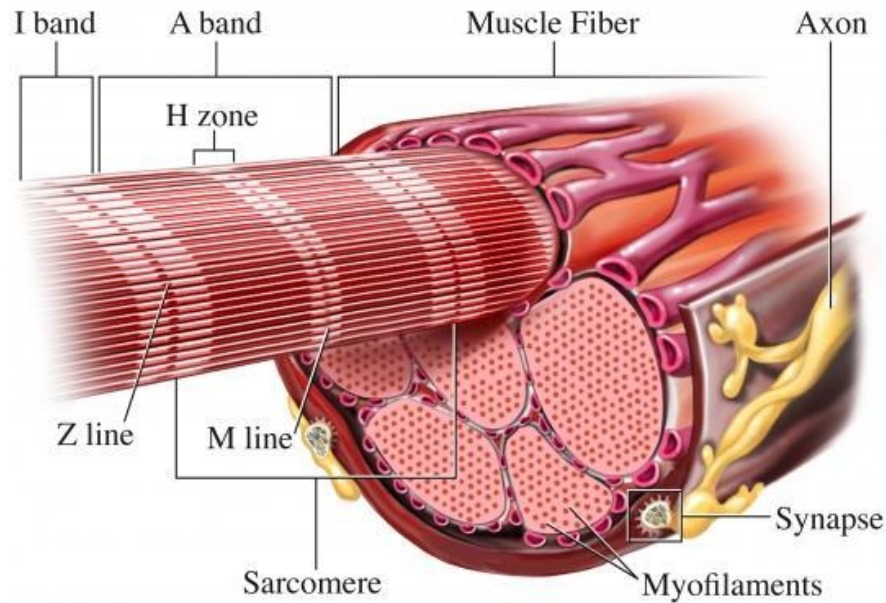
La contracción se inicia en la banda A, en la que los filamentos finos y gruesos presentan superposición. Durante el ciclo de contracción, la actina y la miosina interactúan de la manera siguiente: durante el reposo, el ATP se une a la ATPasa de las cabezas de la miosina. Para atacar la molécula de ATP y liberar energía, la miosina necesita la actina, que

### FIGURA 2.1 Moléculas de Actina, miosina, tropomiosina y troponina y modo de acción de la contracción [9].

Como las células musculares son más largas que anchas, a menudo se les denomina fibras musculares. A la membrana de la célula muscular se le denomina *sarcolema* y al citoplasma *sarcoplasma*. Las mitocondrias son *sarcosomas* y el retículo endoplásmico es el *retículo sarcoplásmico*. El diámetro de las fibras musculares esqueléticas oscila entre 10 y 100  $\mu m$  [9].

El músculo esquelético está revestido de tejido conectivo denso de colágeno denominado epimisio, que penetra en el interior de la sustancia del músculo microscópico y lo separa en fascículos. Está rodeado por *perimisio*, un tejido conectivo más laxo. Por último cada fibra muscular aislada dentro de un fascículo está envuelta en finas fibras reticulares, el *endomisio*. [10].

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS



**FIGURA 2.2 Esquema de la organización histológica del músculo [21].**

El tejido conjuntivo del músculo también tiene vasos linfáticos y nervios [9]. La innervación y la irrigación sanguínea del músculo transcurren por estos compartimentos interconectados del tejido conectivo. Los músculos esqueléticos están compuestos de sincitios (fibras musculares, miocitos). Cada fibra de músculo esquelético tiene una forma casi cilíndrica y contiene múltiples núcleos alargados ubicados en la periferia de la célula justo por debajo del sarcolema y orientados paralelamente a la longitud de la fibra.

Los denominados nervios motores son los encargados de controlar la contracción de las fibras musculares esqueléticas, los cuales se ramifican en el tejido conjuntivo del perimysio en el que cada nervio origina numerosas ramas. En la zona de contacto con la fibra muscular, la rama final del nervio pierde su vaina de mielina y forman una dilatación que se introduce en una depresión existente en la superficie de la fibra muscular. Esta estructura se denomina placa motora o unión mioneural, en donde el axón está recubierto por una fina capa de citoplasma de Células de Schwann. La terminación axónica muestra abundantes mitocondrias y vesículas sinápticas con el neurotransmisor acetilcolina. En la unión mioneural [9].

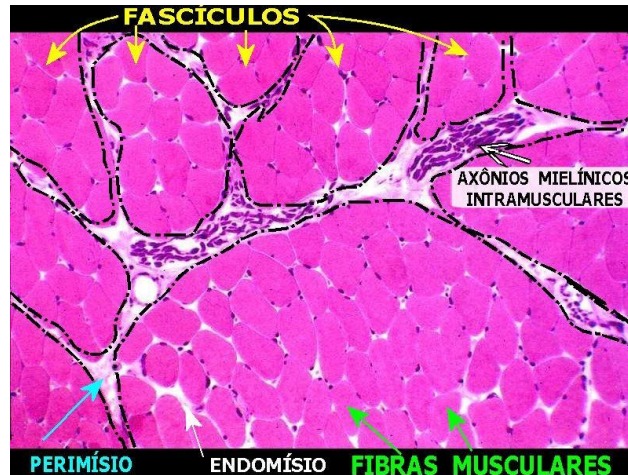
Las fibras musculares cortadas en sentido longitudinal muestran elementos contráctiles intracelulares, que son disposiciones paralelas de las miofibrillas organizadas en sentido longitudinal. Esta disposición produce un efecto global de bandas transversales claras y oscuras alternadas que atraviesan cada célula del músculo esquelético.

Las bandas oscuras son bandas A y las claras, bandas I. cada una de las bandas I está cortada por un delgado disco Z oscuro, y la región de la miofibrilla que se extiende desde un disco Z hasta otro disco Z, el *sarcómero*, es la unidad contráctil del músculo esquelético. La banda A es cortada por una zona H más pálida cuyo centro está marcado por el disco M oscuro. Durante la contracción muscular las diversas bandas transversales presentan un comportamiento

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

característico, dado que el ancho de la banda A permanece constante, los dos discos Z se acercan entre si hacia la banda A, Y la banda I y la zona H desaparecen.

En el músculo normal las fibras tienen un diámetro regular y acomodándose una a otras tomando contorno poligonal con ángulos redondeados. Los mionucleos son periféricos ocupando posición subsarcolemal.



**FIGURA 2.3** Histología de músculo normal señalando fibras musculares, fascículos, perimísio, endomísio y axones [19].

Según estructura y composición molecular, existen dos tipos de fibras musculares normales, las tipo I y II. Las tipo I, son fibras de contracción lenta y de fatiga difícil, que dependen de la fosforilación oxidativa para la obtención de energía, por lo tanto son ricas en mitocondrias y en mioglobina (que sirve para el transporte de oxígeno al interior de la fibra) Estas fibras están adaptadas para realizar contracción sostenida. Las fibras tipo II en cambio, son fibras de contracción rápida y de fatiga fácil, que utilizan glicólisis anaeróbica para la obtención de energía y son pobres en mitocondrias y mioglobina.

## 2.2 Patología muscular

Las enfermedades musculares son una causa importante de incapacidad. Muchas son de base genética y comienzan en la infancia por lo que interfieren con la adquisición de las primeras habilidades motoras. Son muy importantes las medidas preventivas, diagnósticas y terapéuticas de este grupo de enfermedades.

El diagnóstico de una afección muscular se basa en tres pilares. El cuadro clínico, la alteración del EMG y la elevación de las enzimas musculares en la sangre lo que permite en muchas ocasiones únicamente el diagnóstico genérico de una miopatía. Para el diagnóstico etiológico suele ser necesario el estudio genético y bioquímico general y el estudio histológico y o metabólico de la biopsia muscular.

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

La aplicación de las técnicas de genética molecular esta revolucionando el conocimiento y la nosografía de la mayoría de las miopatías de base hereditaria y se ha convertido en un instrumento esencial y de primera opción que puede obviar la necesidad de hacer una biopsia estrictamente diagnóstica en muchos casos. Sin embargo la realidad en nuestro país indica que estos exámenes son muy onerosos como para aplicarlos como herramienta diagnóstica en nuestro país, por lo que la biopsia muscular sigue siendo la herramienta de primera opción.

Todas las fibras de una misma unidad motora son del mismo tipo histoquímico. Hay pocas miopatías que afecten selectivamente a uno u otro tipo de fibra. En general se atrofian todas ellas. La atrofia selectiva de las fibras tipo II es inespecífica y se observa en muchas situaciones, desde el desuso a muchas enfermedades generales.

Los signos histológicos comunes a la mayoría de las miopatías son la desproporción marcada del calibre de las fibras con algunas atroficas y otras hipertróficas. Las fibras hipertróficas tienen tabiques internos. Y centralización de los núcleos. Hay un aumento del tejido conectivo y grasa entre las fibras musculares. Las fibras pueden tener signos de necrosis con imágenes de fagocitos. Otras fibras pueden mostrar signos regenerativos (basofilia con núcleos prominentes). Otras imágenes de gran valor diagnóstico son los focos inflamatorios en las miositis, las inclusiones y las vacuolas ribeteadas en las miositis con cuerpos e inclusión, los depósitos de glucógeno en la glucógenolisis o de lípidos en las miopatías lipídicas, los acúmulos mitocondriales anormales (fibras rojas rotas) y las imágenes características de las diferentes miopatías congénitas. Las tinciones de inmunohistoquímica permiten hoy demostrar el déficit de varias enzimas.

Las patologías musculares se pueden clasificar en 3 grandes grupos como muestra la tabla 2.1.

**TABLA 2.1 Clasificación general de la patología muscular [11].**

<b>Clasificación general de la patología muscular</b>	<b>Sub-clasificación 1</b>	<b>Sub-clasificación 2</b>
1.- Distrofias musculares	Distrofia de Duchenne	
	Distrofia de Becker	
2.- Miopatías	Inflamatorias	Dermatomiositis
		Polimiositis
		Miositis por cuerpo de inclusión
	Metabólicas	Miopatías mitocondriales
	Congénitas	central core nemalínicas
3.-Enfermedades neurogénicas	Atrofia mioespinal tipo I	
	Atrofia mioespinal tipo II	
	Atrofia mioespinal tipo III	

La clasificación de las miopatías en sus grupos principales se encuentra en la tabla 2.1.

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

Describiremos solo las que tienen relevancia para nuestro trabajo de investigación

### 2.2.1 Distrofias musculares

Son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticamente determinadas en las que se produce una degeneración progresiva del músculo esquelético de comienzo general en la niñez [10]. El gen de la distrofina está localizado en el cromosoma X (Xp21), uno de los genes más grandes hasta ahora descrito.

De las distrofias musculares, nos referiremos a las distrofias ligadas al cromosoma X y sus dos variedades clásicas y más importantes son la distrofia de Duchenne DMD y la distrofia de Becker. Corresponden a distrofinopatías, que tienen un gen mutante que codifica la distrofina, que es una proteína estructural del citoesqueleto de la membrana del músculo [11], la cual al estar ausente determina una fragilidad y permeabilidad anormales de las membranas llevando a una mala regulación del calcio que activa la hidrólisis de fosfolípidos y que produce la necrosis progresiva de las fibras musculares [14].

#### 2.2.1.1 Distrofia muscular de Duchenne

Es la enfermedad letal ligada al cromosoma X más frecuente y la más grave de las distrofias musculares [1]. Su prevalencia es de 3/100.000 y la incidencia aproximada de 1/ 4.000 varones nacidos vivos [14]. Afecta solamente a varones [11].

Se caracteriza por la rápida pérdida progresiva de la función muscular que comienza en las extremidades inferiores y que progresa rápidamente y afecta posteriormente a todo el cuerpo [1].

Los primeros síntomas generalmente aparecen en los hombres de los 2 a los 4 años de edad, siendo característico de esta distrofia el engrosamiento de las pantorrillas (seudohipertrofia) [10]. El cuadro completo de la DMD incluye cardiomiopatía, miopatía esquelética y bajo coeficiente intelectual. Por lo general, la muerte ocurre cerca de los 25 años, debido particularmente a trastornos respiratorios (pulmonares). [1]

La biopsia muscular se realiza principalmente para confirmar diagnóstico, observándose signos de necrosis frecuentemente en grupos de fibras e intensa infiltración grasa y de tejido conectivo. Son características las fibras grandes redondas e intensamente eosinófilas.

#### 2.2.1.2 Distrofia muscular de Becker

Estudios genéticos han demostrado que se trata de una entidad distinta ya que no se encuentra en una misma familia [1]. Es un trastorno hereditario, caracterizado por una lenta y progresiva debilidad de los músculos de las piernas y de la pelvis. Su incidencia aproximada es de /20.000 nacimientos de varones vivos. Aquí la distrofina está presente, a diferencia de la enfermedad de Duchenne, pero es anómala. El síndrome clínico es similar en todos los aspectos a la DMD excepto en su comienzo que es más tardío y su evolución más lenta [14].

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

El comienzo suele ubicarse entre el término de la niñez y la adolescencia. [10]. La edad promedio a la cual se vuelven incapaces de andar es de 25 a 30 años y las mujeres raramente desarrollan síntomas. La capacidad para caminar puede continuar hasta los 40 años de edad o más. El diagnóstico es similar a la Distrofia muscular de duchenne [14].

### 2.2.2 Miopatías inflamatorias

Las miopatías inflamatorias idiopáticas (MII) o miositis idiopáticas constituyen un grupo de enfermedades caracterizadas por inflamación muscular primaria con necrosis de fibras [11]. Se encuadran en las enfermedades neuromusculares, que cursan con pérdida de fuerza y/o dolor muscular, y comprenden: a) trastornos de motoneurona; b) trastornos de la transmisión neuromuscular, y c) trastornos intrínsecos del músculo o miopatías.

Afecta a personas de todas las edades, con un pico de incidencia en niños de alrededor de 10 años de edad y otro en adultos alrededor de los 40. En las MII asociadas a cáncer y por cuerpos de inclusión la edad de comienzo es mayor, en torno a 60 años. Estas enfermedades son consideradas autoinmunes, aunque se desconoce su etiopatogenia. La forma de presentación más frecuente de las MII es la pérdida de fuerza proximal y simétrica.

Las tres pruebas fundamentales para el diagnóstico de MII son la determinación sérica de enzimas musculares, el electromiograma y la biopsia muscular<sup>3</sup>.

Las miopatías inflamatorias son caracterizadas patológicamente por mionecrosis e infiltrado mononuclear infiltra y clínicamente por la debilidad y debilidad muscular y CK y VHS elevadas. Las miopatías inflamatorias principales son:

- Polimiositis (PM),
- DM dermatomiositis (DM)
- Miositis de cuerpo de inclusión (MCI).

#### 2.2.2.1 Miositis por cuerpo de inclusión

La miositis de cuerpo de inclusión o MCI es la tercera forma principal de miopatía inflamatoria idiopática después de la polimiositis y dermatomiositis. Se caracteriza por presentarse en ancianos [11].

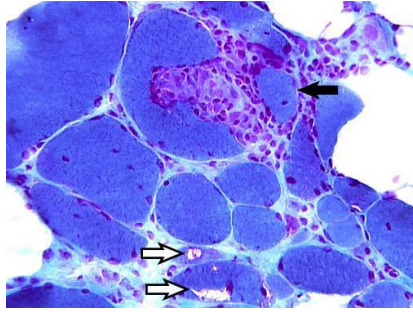
Los datos histológicos característicos son las vacuolas "bordeadas" con gránulos basófilos en su interior y las inclusiones tubulofilamentosas, intranucleares e intracitoplasmáticas en las miofibras, aunque el dato más específico es la demostración ultraestructural de filamentos de 15-21 nm de diámetro.

La biopsia muscular muestra miositis, necrosis y vacuolas intracitoplasmáticas e inclusiones filamentosas en el citoplasma [11]. Las vacuolas contienen un material granuloso basófilo y están rodeadas por el, aspecto que establece la diferencia con las vacuolas reconocidas en algunos casos de polimiositis. Los estudios ultraestructurales ponen de manifiesto que se acumula esta proteína en los focos de la estructura tubulofilamentosas anormales tanto en los núcleos como en

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

los citoplasmas o cerca de estos focos. No esta clara la naturaleza de estos diversos cambios miopáticos.

La tinción de Gomori modificada muestra fibras musculares conteniendo vacuolas (flechas abiertas) e infiltrado inflamatorio mononuclear invadiendo una fibra muscular no necrótica (flecha negra). Copyright, Isabel P Collins, MD, 2000.



**FIGURA 2.4 Tinción Tricrómica de Gomori Modificada 40x [22].**

### 2.2.3 Patologías metabólicas

#### 2.2.3.1 Miopatías mitocondriales

Las patologías mitocondriales son un grupo heterogéneo y complejo de enfermedades que pueden afectar a distintos tejidos. Algunas enfermedades mitocondriales están limitadas al músculo y otras muchas producen una afección multisistémica. La distribución de mitocondrias anormales puede ocurrir en varios tejidos y órganos del cuerpo. Los más afectados son aquellas que tienen el metabolismo oxidativo alto, vale decir que dependen predominantemente de la energía mitocondrial, como el sistema nervioso central, musculatura esquelética, riñones, sistema endocrino, retina, corazón. Por ello se habla también de citopatías mitocondriales. Puede haber una amplia variación y combinación de signos y síntomas, originando varios síndromes mitocondriales. [13] Nos referiremos a las patologías mitocondriales musculares.

Las mitocondrias son las organelas pequeños encargadas de la producción de la mayor parte de la energía de las células a través de la síntesis de ATP mediante reacciones de oxidación-reducción secuenciales localizadas en la matriz y en la membrana interna de la mitocondria, la cual se realiza en varios pasos metabólicos cada uno de los cuales pueden dar lugar, si se alteran, a cuadros clínicos [13]. Estos pasos son:

1. Transporte de sustratos
2. Déficit de sustrato
3. Ciclo de Krebs
4. Acoplamiento oxidación fosforilación
5. Cadena respiratoria.

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

Las últimas etapas de la producción de energía se llevan a cabo mediante el sistema de fosforilación oxidativa localizado en la membrana interna mitocondrial. La tendencia general hoy en día es restringir el concepto de enfermedades mitocondriales a las que afectan la vía final de la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria y más en concreto a las que se deben a mutaciones en el ADN mitocondrial (DNA mt). Los defectos metabólicos mitocondriales identificados hasta el momento son defectos en los complejos proteicos de la cadena respiratoria I, III Y IV. [14].

La mitocondria posee una composición genética peculiar, puesto que cada mitocondria posee su propio DNA mitocondrial distinto del DNA nuclear. Trece de las subunidades de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria, aproximadamente una quinta parte de las proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa mitocondrial, son codificadas y sintetizadas por el genoma mitocondrial [10]. Este hecho contribuye a la complejidad de sus alteraciones.

El ADNmt o ADN mitocondrial es una pequeña molécula circular de ADN de 16.6 Kb [10]. presente en la matriz mitocondrial a razón de 5 a 10 copias por organela. Las mutaciones en esta ADN son comunes y de difícil reparo. Son transmitidas a las generaciones siguientes por herencia materna, diferente de la herencia mendeliana. Es por esto que las miopatías siguen un patrón de herencia particular. Se afectan generaciones sucesivas y se presentan en ambos sexos como en la herencia autosómica dominante, pero únicamente las transmiten las mujeres dado que el ADNmt se hereda exclusivamente de las madres (por ser el ovocito el que aporta la gran mayoría de mitocondrias en el momento de la fecundación al embrión) [12]. Este hecho explica que estas enfermedades se transmitan desde la madre a todos los hijos independientemente del sexo de éstos y por ello el trastorno nunca puede heredarse del padre.

Las mutaciones más comunes son puntuales, pero pueden haber deleciones y duplicaciones de largos segmentos de ADN. La distribución de las mutaciones en el DNAm es irregular en las células. En la multiplicación celular embrionaria las mitocondrias son repartidas entre las células hijas de forma aleatoria. Si hubieran mutaciones en el ADNmt, éstas pueden afectar solo una parte de las organelas a distribuir, de manera que ciertas células tendrán muchas mitocondrias y otras pocas. Si la proporción de organelas con ADN mutante excede un valor límite, las mitocondrias funcionantes serán insuficientes para generar energía a la célula. Las mitocondrias entonces proliferan numéricamente (alteración de tipo policlonal) y/o aumentan de volumen (alteración de tipo megaconial) incrementando las masas de estas organelas en el citoplasma. Pueden también perder la morfología normal (dupla membrana con membrana interna sinuosa formando crestas) y asumir configuraciones bizarras y formar inclusiones para-cristalinas [14].

El diagnóstico de este grupo de enfermedades se basa en el conjunto de datos clínicos, alteraciones analíticas, alteraciones histopatológicas y patrones de herencia. Se presentan típicamente al principio de la etapa adulta (menos frecuentemente en la infancia) y se manifiestan en forma de debilidad muscular proximal, a veces con grave oftalmoplejia externa. La debilidad puede estar acompañada de otros síntomas neurológicos, acidosis láctica y miocardiopatía. Con base a las manifestaciones clínicas y hallazgos en los estudios diagnósticos, algunas de las enfermedades mitocondriales se han agrupado en síndromes bien descritos relacionados a mutaciones definidas. Los principales síndromes [14] son:

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

- a) Miopatías mitocondriales
- b) Síndrome de Kearns-Sayre
- c) Encefalomiopatías mitocondriales
- d) Síndrome de MERFF
- e) Síndrome de MELAS
- f) Síndrome de NARP

### a) Miopatías mitocondriales

Son los síndromes mas frecuentes, con fenotipos muy variados. Son miopatías simétricas que comprometen la musculatura proximal, reconocidas por primera vez en 1966 por Shy *et al.* Pueden ocurrir a cualquier edad, aisladamente o en combinación con la disfunción del SNC. De las mutaciones asociadas al síndrome predominantemente miopáticas la mas común esta en la posición 3250 do genoma mitocondrial.

Los signos y síntomas frecuentes son la debilidad, la intolerancia al ejercicio, debilidad muscular proximal, y oftalmoplejia, que están presentes en mayor o menor medida en los diferentes tipos de miopatías [12]. La progresión es extremadamente lenta y el paciente puede llevar una vida prácticamente normal. Si su presentación es precoz, estamos hablando del extremo grave de la enfermedad esta una miopatía infantil con flaqueza y acidosis láctica que se vuelve evidente en la 1ª semana de vida y es fatal antes de un año. La actividad de la citocromooxidasa está prácticamente ausente en el tejido muscular.

El diagnóstico se realiza principalmente por medio de biopsia muscular. Histológicamente, se pone de manifiesto las alteraciones existentes a nivel mitocondrial. Las alteraciones pueden ir de mínimas a intensas. Puede haber variación del diámetro y contorno irregular de las fibras, que pueden ocurrir en miopatías de varias naturalezas. El hallazgo principal y mas característico es la aparición en el sarcoplasma de múltiples “rasgaduras” o “hendiduras” vacías tapizadas por material fuertemente positivo con las técnicas de enzimas oxidativas (NADH, SDH, COX). Estas masas sarcoplasmáticas también se acumulan por debajo del sarcolema, y consisten en mitocondrias aumentadas en número y tamaño, con crestas anormales y con “cristaloides” en los espacios intercrestas. La naturaleza mitocondrial del material es demostrable por la reacción SDH, una enzima que solo existe en las mitocondrias o por microscopia electrónica, donde se comprueba que contienen acumulaciones de mitocondrias con una distribución, tamaño y morfología anormales y algunas de las fibras contienen inclusiones paracrystalinas con forma de aparcamiento [12].

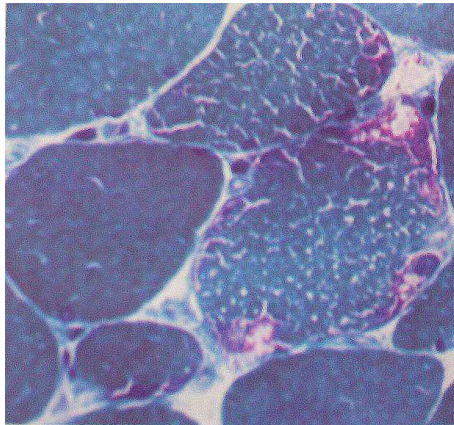
## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS



**FIGURA 2.5 Micrografía electrónica que muestra inclusiones tipo aparcamiento [12].**

Con la histoquímica, este material es demostrable mediante la Técnica Tricrómica de Gomori Modificada, que muestra las llamadas, en inglés, “Ragged Red Fibers”, cuya traducción sería algo como “ fibras rojas rotas” o “fibras rojas melladas”, debido a que también se asocian a una deformación de las miofibrillas y el contorno de la fibra muscular se vuelve irregular. [12]. Este es el hallazgo característico (aunque no patognomónico) ya que no todas las enfermedades mitocondriales presentan fibras rojas rotas en la biopsia, si no solo aquellas que producen alteraciones en la estructura de las mitocondrias. Se observan fibras “rojas rotas” en general en las enfermedades que se deben a grandes mutaciones de ADNmt que se transcribe a un ADNt. No suele haber ese tipo de fibras anormales en las enfermedades con mutaciones puntuales del ADNmt que se transfiere a un ARN mensajero, aunque hay excepciones a esas reglas.

El diagnóstico diferencial de las fibras “rojas rotas” debe hacerse con los cuerpos nemalínicos, los cuales también pueden teñir rojo y luego acumularse bajo el sarcolema, pero no tiene reactividad enzimática.



**FIGURA 2.5 Miopatía mitocondrial que muestra una fibra irregular con colecciones subsarcolemales de mitocondrias que se tiñen de rojo con el Tricrómico de Gomori Modificado (fibra roja mellada) [12].**

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

En la tinción enzimática para citocromooxidasa (COX) la mayoría de las fibras rojas rotas son negativas para COX (son positivas en el síndrome de MELAS). La presencia de fibras negativas para COX en una persona joven es patológica, aunque en las personas mayores puede haber un pequeño porcentaje de ellas. Los niveles de CPK pueden estar normales o discretamente elevados.

Hay que tener en consideración que alteraciones mitocondriales como las descritas pueden estar presentes en enfermedades tan diversas como distrofias musculares, miopatía facio-escápulo-humeral, polimiositis, dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, atrofia por denervación, y déficit de maltasa ácida del adulto, por lo cual el conjunto de datos clínicos, junto a las alteraciones en las pruebas analíticas, así como el estudio genético, permiten establecer el diagnóstico.

### b) Síndrome de Kearns-Sayre

El síndrome de Kearns-Sayre o “oftalmoplejia plus” [12]. fue la primera de las patologías mitocondriales descritas y representa la forma más severa. Las manifestaciones clínicas principales son la oftalmoplejia externa progresiva, la retinitis pigmentosa, bloqueo cardiaco, entre otros [12]. Los niños que logran sobrevivir, desarrollan el síndrome de Kearns-Sayre. El defecto genético más frecuente es una delección del ADNmt < (95%) y aparece casi siempre de forma esporádica en una persona joven, aproximadamente antes de los 20 años.

Para los clínicos el problema principal de las enfermedades mitocondriales es su heterogeneidad. Son capaces de presentarse por una constelación de signos y síntomas. A veces es la historia familiar la que da la clave al problema. La evaluación incluye determinación de ácido láctico sérico y biopsia muscular.

### c) Encefalomielopatía necrotisante subaguda, ou síndrome de Leigh.

En grupo de síndromes los pacientes presentan una combinación de signos y síntomas de disfunción cerebral y de miopatía mas o menos grave. Es una dolencia mitocondrial familiar o esporádica con una amplia gama de manifestaciones clínicas.

Las alteraciones patológicas consisten en focos bilaterales simétricos de necrosis espongiiforme con degeneración de la mielina y proliferación vascular. La histoquímica es normal pero el número de mitocondrias esta aumentado en el músculo. Varias mutaciones mitocondriales pueden dar el cuadro clínico y patológico de éste síndrome [19].

### d) Epilepsia mioclónica con ragged red fibers (MERRF).

Se presenta como una epilepsia mioclónica progresiva o ataxia mioclónica. Hay varios tipos de crisis convulsivas asociadas a exposición a luz fuerte. La ataxia tiende a primar progresivamente, eclipsando las mioclonías y convulsiones. La miopatía es generalmente inaparente. La observación de anomalías mitocondriales en las fibras musculares es necesaria para el diagnóstico clínico. Cuando mas precoz el inicio, mas grave es la dolencia.

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

- e) Miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios tipo AVC (MELAS).

El desenvolvimiento es inicialmente, seguido por retardo de crecimiento, convulsiones generalizadas o focales y episodios que parecen accidente isquémico. Puede haber una acidosis láctica. Histológicamente, la mayoría de los pacientes tiene fibras del tipo “*ragged red*”, pero la flaqueza e intolerancia al ejercicio son mas bien raras. Las fibras rojas rotas son positivas para cox.

- f) Síndrome de neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP).

Puede incluir retardo del desarrollo, convulsiones y debilidad proximal. La herencia es materna. Es causada por una sustitución de un solo nucleótido en la posición 8993 del DNAm. Esto genera un error en la ATPsintetasa (complejo V). La severidad de la enfermedad es proporcional a la cantidad de DNA aberrante en el genoma mitocondrial [19].

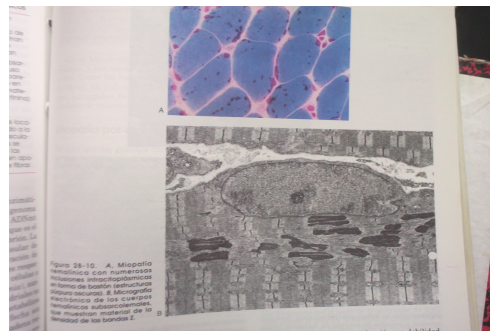
### 2.2.3 Miopatías congénitas

Son un grupo heterogéneo de patologías, caracterizadas por la presencia de lesiones anatomopatológicas específicas. De patogénesis desconocida, pese a que se han descrito algunos defectos genéticos. Muchas son hereditarias. Existen algunas manifestaciones clínicas comunes como debilidad muscular de muy lenta progresión que puede asociarse a alteraciones esqueléticas, cardíacas y oculares.

Describiremos los aspectos más importantes que tienen relación con nuestro trabajo de la patología nemalínica y la miositis de cuerpo de inclusión.

#### 2.2.3.1 Miopatía nemalínica

Puede presentarse en el período neonatal o en la primera infancia, aunque también existen formas del adulto. Existen formas con herencia autosómica dominante y recesiva.

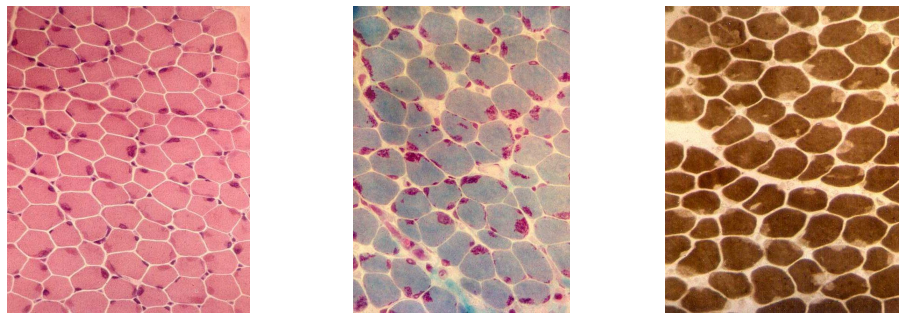


**FIGURA 2.6 Cuerpos nemalínicos con tinción tricrómica de Gomori. [12].**

Se caracteriza por un acúmulo de corpúsculos bastoneiformes de 1-5  $\mu$ m de longitud en fibras musculares. Comúnmente el acúmulo es subsarcolemal, vale decir, en la periferia de la fibra. Pueden ser difíciles de identificar con HE, pero son bien nítidos con Tricrómico de Gomori

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

Modificado, donde se colorean de bermellón en contraste con las miofibrillas coloreadas de azul verdoso. En la reacción de ATPasa se notan como imágenes negativas ya que no reaccionan. Suele existir, además, un predominio y atrofia de las fibras de tipo I.



**FIGURA 2.7 De izquierda a derecha: tinción con H-E, Tricrómico de Gomori Modificado ATPasa (tipo1, por tratarse de ATPase en pH.4.6). [19]**

[37] Los cuerpos nemalínicos tienen una estriación longitudinal; tienen propiedades bioquímicas y estructurales de discos Z y parecen derivar de proteínas asociadas a las bandas Z, principalmente alfa-actina. Aunque los cuerpos nemalínicos son la marca diferencial de la miopatía nemalínica, ellos son vistos también en fibras que han perdido filamentos gruesos, miopatías asociadas con ciertos tipos de virus VIH, algunos casos de dermatomiositis y polimiositis.

### 2.2.3.2 Enfermedad de los cuerpos centrales (*CENTRAL CORE*)

Es la más frecuente de las miopatías congénitas benignas. Se transmite con un patrón de herencia autosómico dominante.

Los cuerpos centrales (*cores*) son zonas cilíndricas situadas en el centro (aunque también pueden estar en la periferia) de las fibras musculares en las que no existen mitocondrias, por lo que se detectan fácilmente cuando se utilizan marcadores de la actividad oxidativa tales como el NADH, la SDH o COX). [37]. Aunque de forma menos llamativa, también son visibles con el tricrómico de Gomori. En los cortes transversales, estas estructuras pueden ser únicas y estar situadas en el centro, o bien múltiples. Utilizando una técnica de ATPasa, éstos cuerpos pueden manifestarse o no. En los llamados cuerpos estructurados se conserva la actividad ATPasa, puesto que la estructura de los sarcómeros se conserva, aunque existe una cierta pérdida de la correspondencia o desplazamiento de las líneas Z, que adoptan una estructura en zig-zag. Por el contrario, en los cuerpos no estructurados existe una completa desorganización del patrón miofibrilar, con total destrucción de las bandas, por lo que se pierde la actividad ATPasa. Los cuerpos centrales aparecen en las fibras de tipo I. Junto a estas alteraciones, suele existir un predominio de fibras de tipo I que en algunos casos puede afectar al 100% de las fibras.

### 2.2.4 Enfermedades neurogénicas

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

La denervación es una de las alteraciones patológicas más comunes en el músculo. Ocurre la pérdida del axón motor o de toda la motoneurona. Existen muchas causas. La fibra muscular denervada sufre de atrofia simple, con reducción de volumen por disminución del número de miofibrillas. El contorno externo de la fibra, que normalmente es poligonal con ángulos redondeados se torna angulado, debido a la compresión por las fibras vecinas atróficas.

Hay variación del diámetro de las fibras, siendo las menores atróficas (denervadas) y las mayores probablemente hipertróficas. Como las fibras atróficas quedan próximas, se habla de una atrofia en pequeños grupos, otra importante característica de la denervación crónica.

Las alteraciones atróficas pueden resultar de diversas alteraciones, como puede ser el envejecimiento por disminución del riego sanguíneo, la inmovilización, la desnutrición, por enfermedades crónicas y en particular por denervación, cuya alteración puede encontrarse a nivel medular o en los nervios periféricos [10]. Una de las formas de diagnosticar esta patología es por biopsia muscular aplicando técnicas que demuestren una degeneración de los filamentos nerviosos [10]. Pueden afectar a ambos tipos de fibra, pero sobre todo al tipo 2 [11].

### **2.2.4 Atrofias**

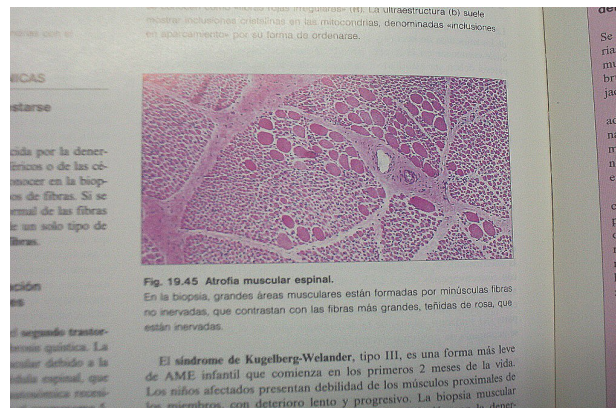
#### *2.2.4.1 Atrofia muscular espina (AME)*

Tres tipos principales de atrofia muscular espinal (AME): amiotrofia espinal tipo I, II y III. [1].

La forma clásica y más grave es la enfermedad de *Werdnig-Hoffman* o amiotrofia espinal infantil tipo I y se hereda de modo autosómico recesivo, siendo después de la fibrosis quística la principal causa de muerte por herencia recesiva. [1]. Se caracteriza la presencia en los neonatos de una debilidad poco habitual, a los que se les denomina “niños flácidos”. Generalmente pocos sobreviven después de un año (adams).

La amiotrofia espinal proximal o tipo III, de la infancia y la juventud, la atrofia es menos intensa que la tipo I, es conocida como enfermedad de Wohlfart-Kugelberg-Welander, en la cual el inicio es mas tardío. [1]

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS



**FIGURA 2.8 Alan Stevens. Ame grandes áreas musculares formadas por minúsculas fibras no inervadas que contrastan con las más grandes, si inervadas [11].**

La biopsia muscular de las amiotrofias muestran grandes grupos de miofibras anormalmente pequeñas que nunca han estado inervadas [11] espinales hay claramente dos poblaciones musculares y un cambio en la distribución de los tipos de fibras [11]. Una de fibras mayores y otra de fibras muy atroficas,

pudiendo llegar a ser 5 veces menor. Es característico que las fibras formen grandes grupos (atrofia en grandes grupos) y fascículos enteros pueden estar compuestos por fibras atroficas. Las fibras mayores probablemente no son normales sino hipertrofias, para compensar el déficit funcional de las atroficas. Las fibras musculares atroficas tienen, sin embargo, una arquitectura semejante a la de las normales, siendo los núcleos periféricos y de contorno circular. No se observan fibras atroficas anguladas porque el carácter angulado esta dado por la compresión por las fibras vecinas, y acá este fenómeno no ocurre.

### 2.3 Biopsias de músculo y nervio.

La biopsia muscular es una de las herramientas más poderosas para el diagnóstico de miopatías. Sin embargo, tiene el inconveniente de que las técnicas habituales son insuficientes. El tejido muscular presenta alteraciones muy inespecíficas comunes a múltiples patologías cuando se valora mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina. Para encontrar alteraciones específicas de enfermedades concretas es necesario profundizar más en la valoración del tejido. Y esto supone, por ejemplo, valorar el estado de los diferentes tipos de fibras (básicamente tipo 1 y 2), el estado oxidativo, la presencia de inclusiones, etc. En resumen, deben emplearse técnicas histoenzimáticas. [1]

Para que el diagnóstico por medio de biopsia muscular tenga valor diagnóstico, las técnicas tanto quirúrgicas como microscópicas deben ser muy precisas. El músculo que se elige para el estudio tiene que ser accesible; así mismo es necesario contar con evidencias de que esta afectado pero no del todo destruido por la enfermedad en cuestión. No debe haber sido sitio de estudio o inyección o estudio de EMG recientes puesto que el trauma de las agujas produce lesiones necrosantes e inflamatorias locales. La biopsia muscular ayuda a distinguir entre diversos trastornos básicos en los pacientes con enfermedad neuromuscular. [1]

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

Ninguno de los resultados de los procedimientos diagnósticos de laboratorio son infalibles para una enfermedad neuromuscular específica. Cada procedimiento esta sujeto a errores técnicos y sus hallazgos, a interpretaciones erróneas. Un espécimen de biopsia puede researse de un músculo o una porción de un musculo afectado y a causa de este error de muestreo, puede ser negativo en presencia de evidencias clínicas obvias. La resección torpe, la fijación y la tinción inapropiadas pueden producir artefactos que quizás se interpreten de manera errónea como característica de una enfermedad cuando, de hecho, el músculo y el nervio son normales desde el punto de vista microscópico. Como sucede en el estudio de todas las enfermedades, los datos de laboratorio solo tienen significado si se valoran a la luz de los hallazgos clínicos [1].

### 2.4 Técnica Tricrómica de Gomori Modificada.

#### 2.4.1 Historia

La Técnica Tricrómica de Gomori Modificada es una variación de la Técnica Tricrómica de Gomori de un paso, que fue modificada para la tinción de fibras musculares congeladas. Esta técnica combina la tinción plasmática (cromótopo) 2 R [24] y tinción del tejido conectivo (FCF o Fast Green) en una solución de acido fosfotúngstico a la cual se le agrega acido acético glacial [24].

En 1963, WK Engel & GG publicaron una modificación a la tinción Tricrómica de Gomori para secciones musculares congeladas y cortadas en criostato sin fijar Cunningham (Engel & Cunningham, (1963) *Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh frozen biopsy specimens. Neurology, vol.13, pp.921-923*). Esta difiere en importantes aspectos del método original (Tricrómico de Gomori de un paso). Ver tabla 2.2. [15].

**TABLA 2.2 Comparación de las técnicas tricrómica original y la modificada.**

<b>Técnica Tricrómica de Gomori de un paso</b>	<b>Técnica Tricrómica de Gomori Modificada</b>
Utiliza tejidos fijados, incluidos en parafina,	Utiliza tejidos no fijados, En congelación
la tinción utiliza el post morfiente fijador de Bouin (típico de las coloraciones tricrómicas)	No utiliza fijador de Bouin
El Ph de la solución va entre 1.5-2.5 pH.	El pH de la solución debe ser 3.4
Los músculos se tiñen rojos y el tejido conectivo verde.	Los músculos se tiñen verde-azulado y el tejido conectivo verde turquesa.
Hecho para diferencia fibras musculares (rojo) de tejido conectivo (verde)	Para demostrar mitocondrias y cuerpos nemalínicos, en rojo.

El medico que popularizo el empleo de la histoquímica, incluyendo esta técnica, en las biopsias musculares fue Víctor Dubowitz un neurólogo ingles de niños en la década 60, quien ha publicado dos libros en los que habla sobre técnicas histoquímicas como apoyo para el diagnóstico de patologías musculares [5], [6] presenta la técnica de biopsia muscular como una

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

importante herramienta aspectos relacionados al a aplicación de las técnicas histoquímica, microscopía electrónica e inmunocitoquímica y la interpretación diagnóstica de las patologías musculares.

Esta técnica modificada por Engel & GG Cunningham se usa principalmente para las tinciones musculares. La técnica de Gomori de un paso consiste en el protocolo presentado en la tabla 2.3.

**TABLA 2.3 Protocolo de técnica tricrómica de Gomori de un paso.**

Procedimiento	Tiempos
1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada	
2. Colocar en fluido de Buin en estufa a 56°	1 hora
3. Lavar en agua corriente hasta que el colore amarillo se vaya	
4. lavar en agua destilada	
5. Teñir en hematoxilina de Weigert	10 minutos
6. Colocar en solución tricrómica de Gomori	20 minutos
7. Enjuagar con ácido acético al 1%	
8. Enjuagar con agua destilada	
9. Deshidratar y montar	

Los resultados son:

- Fibras musculares: rojas
- Colágeno: Verde
- Núcleos: negros o azul oscuro

El protocolo de la Técnica Tricrómica de Gomori Modificada según la publicación de Engel & Cunningham se presenta en la tabla. 2.4. [15].

**TABLA 2.4 Protocolo de técnica tricrómica de Gomori Modificada.**

Procedimiento	Tiempos
1. secciones sin fijar en Hematoxilina de harris (hemalum).	5 minutos
2. lavar en agua destilada	3 cambios
3. Coloración en la Tinción de Gomori	10 minutos
4.- Paso por ácido acético 0,2 %	Dipping ( <i>a few dippings</i> )
5. Deshidratar y montar en Permunt	

Soluciones

Gomori's Trichrome

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

- Solución A

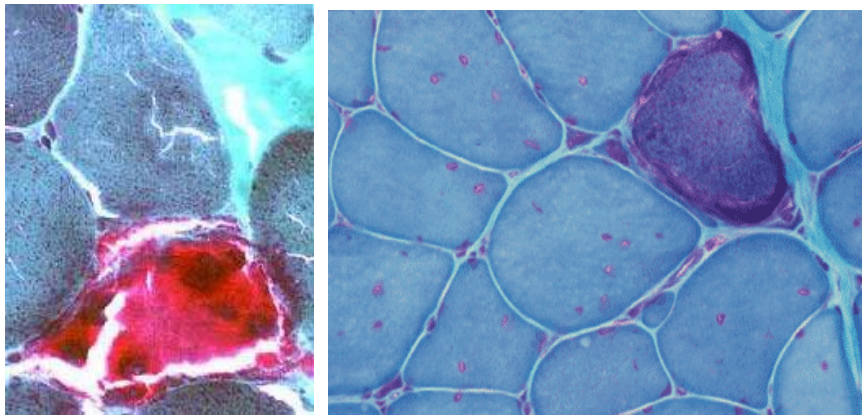
Chromotrope 2R.....0.6 gm  
 Light Green, SF yellowish.....0.3 gm  
 Phosphotungstic acid.....0.6 gm

- Solución B

Glacial acetic acid..... 1.0 ml  
 Distilled Water.....100 ml  
 [2].

Según [2], esta Técnica Tricrómica de Gomori Moho cada cuando se aplica a secciones frescas, revela mas detalles estructurales en parafina. Además, esta tinción facilita la Interpretación de la histoquímica enzimática del mismo espécimen, asi como siendo una coloración rápida para una evaluación preliminar. Otra diferencia está en el no uso de hematoxilina como colorante nuclear, ya que los núcleos adquieren, aun sin tinción nuclear, una coloración rojiza.

La biopsia de músculo estriado esquelético es importante realizarla para el diagnóstico específico de las enfermedades neuromusculares. En este caso, la técnica de Gomori Modificado se caracteriza por colorear las “*ragged red Fibers*” o “fibras rojas rotas”.



**FIGURA 2.9 Tinción tricrómica de Gomori Modificada. A la izquierda, una pronunciada proliferación mitocondrial. Acá las mitocondrias han reemplazado la mayor parte de las estructuras de una de las fibras musculares. A la derecha, Ragged red fibbers. [33]**

#### 2.4.2 Principios de reacción

Esta coloración no enzimática basada en la afinidad diferencial de los componentes tisulares para tinciones de diferentes colores [2]. Fue concebida para para biopsias musculares en congelación. El grosor ideal para cortes en congelación es de 8um [2].

Los detalles de las modificaciones no fueron dados por los autores. Es por eso que variaciones de la técnica tienen efectos desconocidos. Engel & GG Cunningham no hacen referencia a la

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

importancia de cada uno de sus pasos. Los aniones del ácido fosfotúngstico (PTA) cambia a otros aniones (algunos más grandes o más pequeños) en soluciones con pH sobre 2. [16].

En la mayoría de las técnicas tricrómicas contenientes PTA, el pH es menor a 2. En el caso de la solución tricrómica de Gomori además, todos los componentes son ácidos con pH bajos [26]. En un estudio realizado por la [16] se intento explicar los mecanismos de tinción del Acido fosfotúngstico, investigando el modo de interacción de los metales pesados para definir el tipo de grupos funcionales en los sustratos responsables para la unión de PTA. Los resultados obtenidos sugieren que las uniones del Acido se mostraron selectivos para grupos cargados positivamente. Debido a que la interacción del Acido fosfotúngstico con cationes orgánicos es pH dependiente.

Recientemente, Quintarelli, Cifonelli y Zito y Scott por separado han proporcionado pruebas de que los polímeros ricos en hidroxilos pueden formar policationes que fácilmente pueden ser precipitados por PTA. El PTA puede ser usado en un grado óptimo pH en el cual ocurre una alta unión de proteína; la integridad de la molécula PTA es mantenida dentro de una gama estrecha de pH ya que un movimiento hacia el lado alcalino lo divide, por lo visto a dos componentes diferentes químicos; cuando la concentración de ión de hidrógeno es disminuida la reacción de tinción no es más selectiva [16].

Otro punto a analizar es el paso por ácido acético al 0,2%, cuya finalidad es hacer los colores finales más delicados y transparentes [39]. Otra vez nos encontramos con un problema ya que los autores de esta técnica solo indican el paso o “dipping” por esta solución, la cual normalmente previene la remoción de colorantes aniónicos, lo cual es el opuesto a la diferenciación en esta técnica [26]. En cuanto al tiempo que debe ser este paso, los tiempos son variables, siendo según algunos autores de solo un “*dipping*” hasta un paso por ácido acético al 0,2% por 30 segundos [2].

Los pasos siguientes sugeridos por Engel & GG Cunningham indican solo la deshidratación y el montaje sin dar detalles. En general después del paso por ácido acético, de preferencia pasar directamente en alcohol de 100° ya que mezclas de alcohol y agua pueden extraer algunos de los enlaces de colorantes [26].

Los resultados esperables con esta coloración según [2] son los siguientes

**TABLA 2.5 Resultados obtenibles con coloración de Gomori modificada.**

ZONA	COLORACION
Fibras musculares	verde-azulado
Material intermiofibrillar (mitocondrias y retículo sarcoplásmico)	rojo
Colágeno	(verde claro fácilmente)

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

	distinguible de las miofibrillas)
Núcleos	Rojo a púrpura
Mielina	Rojo espumoso
Axones (axoplasma)	Azul pálido

Según [2], si el tejido muscular es expuesto a formalina, esta tinción lo mostrara claramente. Las fibras musculares se tiñen rojas en vez de predominantemente verde azulado.

No todos los usuarios coinciden en la coloración que adquieren las fibras musculares. Así como algunos dicen que estas se colorean de verde claro, otros señalan un color azul oscuro. Otros reparos respecto de la coloración de las fibras musculares es que las fibras degeneradas se tiñen de color verde pálido, lo cual es importante descartar si no es producido por otros factores como el pH [18], [40].

En otros protocolos se señala igualmente la tinción roja de los nervios y la coloración verde – azulada de las miofibrillas Otros más completos aun señalan la coloración de ciertos hallazgos morfológicos de ciertas patologías que ya fueron revisadas en este capítulo, como los “bastones nemalínicos” y el “central core”. Que se colorean rojos. [18].

Se ha atribuido a esta técnica la capacidad de colorear diferencialmente bandas A de bandas I en músculo normal de color verde azulado y más aun, las membranas intermiobribrillares de color rojo [33].

Según [40]. Las fibras musculares tipo I se tiñen verdes con un tono rojizo (“*red cast*”) y las fibras tipo II verdes Se insiste que pese a que ambas son verdes, las fibras tipo II contienen mas material rojo granular que las tipo I (ver histología de las fibras musculares tipo I y II en este capítulo)

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

## 2.4.3 Reactivos

## 2.4.3.1 Cromótopo 2R [3], [4].

- Sinónimos: 2-(phenylazo)chromotropic acid disodium salt, acilan chromotrope RR, Brasilan fast fuchsine G, fast fuchsine G, hispacid fuchsin G, C.I. acid red 29, C.I. 16570
- formula molecular: C<sub>16</sub> H<sub>10</sub> N<sub>2</sub> Na<sub>2</sub> O<sub>8</sub> S<sub>2</sub>

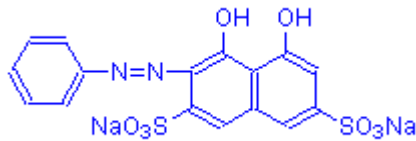


FIGURA 2.10 Molécula de Cromótopo 2R.

Es un ácido de apariencia café rojizo oscuro, en polvo. Es estable. Es incompatible con agentes oxidantes fuertes.

Se puede usar como el colorante citoplásmico en tinciones tricrómicas especialmente las de Gomori, ya que actúa como colorante citoplasmático. [40].

Es un irritante de piel y mucosas, como ojos y vías respiratorias. Es necesario utilizar guantes de seguridad.

## 2.4.3.2 Fast Green FCF [3], [4], [30], ] [27].

- Sinónimos: Food green 3, solid green FCF, FD&C Green No. 3, Green 1724 and C.I. 42053
- formula molecular: C<sub>37</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S<sub>3</sub>

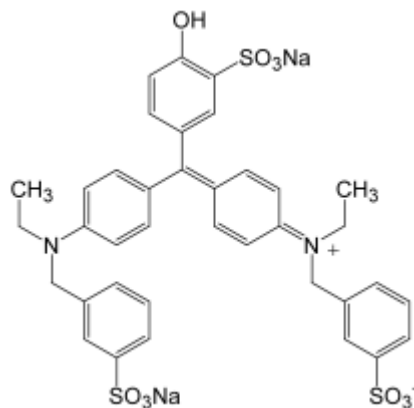


FIGURA 2.11 Molécula de Fast Green [38]

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

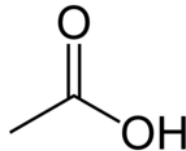
El Fast Green FCF pertenece al grupo de los colorantes de triarilmetano. De apariencia de polvo color verde mar. Punto de fusión 290°C, se descompone. Incompatible con agentes oxidantes fuertes. Es un ácido con una solubilidad del 16%. Después de abrir el frasco por primera vez, el contenido almacenado entre +5°C y +30°C es utilizable hasta la fecha de caducidad indicada. Los frascos deben mantenerse siempre bien cerrados.

Se usa en diferentes métodos de tinción como en la tinción tricrómica de Masson y de Gomori modificado (se usa como sustituto de la anilina azul en la técnica Gomori de un paso) y se ha recomendado como un sustituto para Light green. Se decolora menos fácilmente y es un color más brillante. Puede ser utilizado en cortes en parafina; como colorante en contratinciones, en lugar de verde luz. Su uso como colorante de alimentos en Europa y otros países fue prohibido.

Clasificado como un IARC carcinogénico animal. Además es irritante de la piel, ojos y vías respiratorias. Como protección personal, usar guantes y no aspirar el polvo [34]

### 2.4.3.3 Ácido acético [3], [4], [23]

- Sinónimos: de acuerdo con la IUPAC se denomina sistemáticamente *ácido etanoico*. Ácido metilencarboxílico, Vinagre, etil acetato, Ácido acético glacial.
- Fórmula molecular: CH<sub>3</sub>-COOH



**FIGURA 2.12 Molécula de ácido acético**

El ácido acético se encuentra en el vinagre, y es el principal responsable de su sabor y olor agrios. Es un líquido o sólido incoloro, con un picante olor vinagre. Tiene un fuerte sabor ácido. El punto de fusión es 16.6 °C y el punto de ebullición es 117.9 °C. Peso molecular: 60.05

Es el segundo de los ácidos carboxílicos, después del ácido fórmico o metanoico, que sólo tiene un carbono, y antes del ácido propanoico, que ya tiene una cadena de tres carbonos.

En disolución acuosa, el ácido acético puede perder el protón del grupo carboxilo para dar su base conjugada, el acetato. Su pKa es de 4.8 a 25°C, lo cual significa, que al pH moderadamente ácido de 4.8, aproximadamente la mitad de sus moléculas se habrán desprendido del protón. Esto hace que sea un ácido débil y que, en concentraciones adecuadas, pueda formar disoluciones tampón con su base conjugada.

El producto a altas concentraciones, genera vapores y neblinas tóxicas, puede causar sofocación, quemaduras a la garganta, tos, dolores al pecho. En ojos y piel puede producir quemaduras graves. Es un líquido corrosivo y puede causar severas quemaduras en todo el cuerpo.

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

### 2.4.3.4 *Acido fosfotúngstico PTA* [3], [4].

- Sinónimo: Hidróxido de tungsteno óxido fosfato, ácido tungstofosfórico, N-Hydrate  $H_3PO_4 \cdot 12WO_3$
- Formula molecular:  $H_3[P(W_3O_{10})_4]$

[16] Es un compuesto ácido complejo a base de fósforo y tungsteno. A temperatura ambiente se presenta como un sólido (cristal o polvo) de color blanco o verde amarillento, ligeramente fluorescente. [40] Es casi inodoro. Es soluble en agua en un 67% y su temperatura de fusión (K) es  $107^\circ C$ . Es considerado como un corrosivo. Es utilizado como reactivo para los alcaloides y muchas otras bases nitrogenadas, para los fenoles, albúmina, peptona, aminoácidos, ácido úrico, urea, sangre y carbohidratos[20].

[34] Es el ácido más fuerte de los heteropoliácidos, y tiene el potencial de servir como un sólido catalizador ácido fuerte para reacciones como alquilación e isomerización esquelética de hidrocarburos. Su base conjugada es el anión  $PW_{12}O_{40}^{3-}$ . El heteropolianión representa la estructura primaria del ácido fosfotúngstico, el cual forma luego una estructura abultada por coordinación de los protones ácidos u otros cationes. Una forma relativamente estable de ácido fosfotúngstico contiene 6 moléculas de agua por heteropolianión y forma un cuerpo centrado de estructura cúbica.

Se usa comúnmente en histología como un componente para tinción celular de muestras, generalmente junto con hematoxilina. Se une a la fibrina, al colágeno y a las fibras de tejidos conectivos reemplazando los aniones de los colorantes de estos materiales, decolorándolos selectivamente. Una de las mayores ventajas de su uso es que el pH puede ajustarse siempre como se desee. Es ideal para demostrar, muchas estructuras, particularmente fibrina, fibras musculares estriadas y mitocondrias, cilios y fibras gliales, entre otras estructuras.

Es un componente ligeramente peligroso a peligroso en caso de contacto con la piel y ojos o por inhalación o ingestión ya que es un irritante. Es tóxico para los pulmones y membranas mucosas.

### 2.4.3.5 *Hidróxido de sodio*

- Sinónimos: hidróxido de sodio, soda cáustica, sosa cáustica
- Formula: NaOH

El hidróxido de sodio es un hidróxido cáustico. Es una sustancia incolora e higroscópica que se vende en forma de trozos, escamas, hojuelas, granos o barras. Se disuelve en agua con fuerte desprendimiento de calor y la disolución acuosa se denomina lejía de sosa. [34] Es usado en la industria (principalmente como una base química) en la fabricación de papel, tejidos, y detergentes. Se encuentra comúnmente en limpiadores de desagües.

A temperatura ambiente, el hidróxido de sodio es un sólido blanco cristalino sin olor que absorbe humedad del aire. [41] Es una sustancia manufacturada que cuando se disuelve en agua o se neutraliza con un ácido libera una gran cantidad de calor que puede ser suficiente como para

## CAPITULO 2: FUNDAMENTO TEORICOS

encender materiales combustibles. El hidróxido de sodio es muy corrosivo. Generalmente se usa en forma sólida o como una solución de 50%.

[41] El hidróxido sódico se fabrica por electrólisis de una solución acuosa de cloruro sódico. Es un subproducto de un proceso que se utiliza para producir cloro.

Es irritante y corrosivo de los tejidos especialmente piel y ojos, así como inhalación de neblinas o polvo. Para el manejo del NaOH es necesario el uso de lentes de seguridad, guantes. Siempre debe manejarse en una campana.

## **CAPITULO 3: Materiales y métodos**

### **3.1 Materiales**

- 16 Tacos de biopsias musculares fijadas en formalina buffer e incluidas en parafina.
- Biopsia de congelación
- Colorantes y reactivos de tricrómico de gomori: ácido fosfotúngstico, Fast green, Cromótopo 2R, ácido acético glacial
- Micrótopo
- Criostato
- Batería de tinción con xiloles y alcoholes y agua destilada
- Pinzas, porta objetos, cubre objetos y medios de montaje.
- Microscopio óptico normal
- Material de vidrio
- Guantes
- Pesa
- Peachimetro

### **3.2 Métodos**

Se analizaron de manera cualitativa 16 muestras seleccionadas del servicio de anatomía patológica de la Universidad de Valparaíso 16 muestras de biopsias musculares diagnosticadas con diversas patologías, tomadas del libro de actas de biopsias musculares y sus tacos en parafina correspondientes y muestra congelada de músculo estriado de biopsia por congelación de esfínter anal.

#### **3.2.1 Diseño de pruebas**

Se estudiaron las biopsias musculares realizándose las siguientes pruebas:

- material fijado en formalina al 10% e incluido en parafina para técnicas habituales con hematoxilina-eosina (H-E) y ácido peryódico-Schiff (PAS)
- tricrómico de Gomori modificado en las 16 muestras incluidas en parafina
- Tinción tricrómica de Gomori modificada realizada en 5 muestras seleccionadas por diagnóstico de Miopatía mitocondrial.
- Se selecciono aleatoriamente la placa 2413 y se realizo la técnica tricrómica modificada con las variables pH 3,4 y el paso por ácido acético al 0,2%
- Tinción con técnica tricrómica de Gomori modificado en material congelado y cortado al criostato sin fijación.

#### **3.2.2 Muestras seleccionadas**

## CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

Biopsias y diagnósticos seleccionados:

No	No de Biopsia	Año	Descripción	conclusión
1.	513	88	Existe una significativa variación del calibre de las fibras. Un porcentaje importante de ellos adopta una morfología redondeada. El espacio interfascicular y perimisial se encuentra aumentado en base a colágeno. Moderado depósito de tejido graso. Las fibras redondeadas presentan polinucleosis significativa, centralización de los núcleos y tendencia a segmentación las fibras de menor calibre presentan un sarcolema de densidad ligeramente mayor al habitual. Ocasionalmente depósitos P.A.S positivo en region subsarcolemal de algunas fibras.	Distrofia muscular de Becker.
2.	514	88	Significativa variación del calibre de las fibras. La gran mayoría de ellas han perdido su citoarquitectura presentan aspecto redondeado en particular las de grueso calibre. Presencia de hialinosis, multiplicación significativa de los núcleos. Aumento del espacio interfascicular, fenómenos de fractura celular de fibras de gran calibre. Presencia de fibras con degeneración miofibrilar importante.	Fenómenos descritos propios de distrofia muscular progresiva.
3.	2028	88	Significativa variación del calibre de fibras. Numerosas fibras adoptan una disposición redondeada con pérdida de la disposición redondeada con pérdida de la angulación normal, polinucleosis de 3 a 4 núcleos en la mayoría de las fibras. Fenómenos de basofilia, segmentación y fragmentación de fibras. Aumento moderado de grasa perimisial	los hallazgos patológicos son propios de distrofia muscular progresiva, ligado al sexo (enfermedad de duchenne)
4.	1877	89	Significativa atrofia fascicular. El calibre de fibras esta disminuido en la mayoría de los fascículos observados desde un diámetro que es menor a una décima de aquel de las fibras mayores. Moderado aumento del espacio interfascicular, ausencia de reacción inflamatoria, ausencia de depósito graso significativo. Predominio de compromiso de fibras tipo 1 en	Enfermedad de Werding Hoffmann

## CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

			aquellos fascículos en vías de atrofia. SDH de distribución homogénea en fibras atróficas. Atrofia fascicular propia de enfermedad de Werding Hoffmann	
5.	480	89	Fascículos con moderada infiltración grasa, significativa atrofia de fibras en la mayoría de los fascículos observados. Las fibras adoptan una configuración angulada en su mayor proporción. polinucleosis y pseudopiolinucleosis marcada. Fibras redondeadas ocasionales de aspecto hipertrofiaos (fenómeno compensatorio). Algunas de ellas con aspecto en torbellino. Escasa diferenciación de fibras en las reacciones de ATPasa. Aumento importante de espacio intrafascicular.	Los fenómenos descritos son propios de denervación y compromiso de motoneurona anterior. Compatibles con enfermedad de Kugelberg welancher
6.	2064	89	Las tinciones muestran tanto hematoxilina, eosina, P.A.S, tricrómico de Masson, como en preparaciones de histoquímica una morfología desprovista de anomalías.	músculo de aspecto normal
7.	2413	89	Variación del calibre de las fibras sin pérdida de angulación normal. polinucleosis y centralización de núcleos, aumento de tejido conectivo intrafascicular agrupamiento de fibras tipo 1 y predominancia de estas en algunos fascículos observados	Los elementos neurológicos orientan a un patrón neurogénico a nivel de músculo mas compatible con neuropatía periférica que con miopatía
8.	155	90	Músculo cuádriceps nervio safeno, con significativo aumento de tejido graso a nivel peri e intrafascicular. Gran variación del calibre de las fibras, las cuales presentan una pérdida de la angulación normal, adoptando una morfología redondeada. Presencia de células en remolino. Fracturas en porcentaje significativo de fibras hipertróficas, no se observa alteraciones a nivel de núcleos	La biopsia muscular es característica de distrofia muscular progresiva ligada al seño duchenne.
9.	363	90	Existe una moderada variación del calibre de las fibras con polinucleosis e infiltrado intrafascicular de tipo mononuclear. Hay una variación significativa del calibre de las fibras	Los hallazgos morfológicos sugieren una miopatía

## CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

			con porcentaje menor de ellas. Existe una polinucleosis moderada	estructural que debe ser definida por microscopia electrónica. La histoquímica excluye central core, deposito, y no orienta a miopatía mitocondrial
<b>10.</b>	<b>569</b>	90	Moderada polinucleosis compatible con proceso de denervación crónica. Cada fibra contiene 2 a 3 núcleos q se ubican en la porción periférica. No hay alteración del calibre de fibras atroficas.	denervación crónica
<b>11</b>	<b>1004</b>	93	Moderada variación del calibre de fibras, presencia de algunas fibras redondeadas que predominan en borde fascicular. Aumento de espacio interfascicular con presencia de linfocitos y del tejido adiposo anexo. El hecho mas significativo es el acumulo de material P.A.S positivo pero también intensamente eosinofílico en he y S.D.H positivo entre las fibrillas. Este deposito que se distribuye homogéneamente en pequeños acúmulos en la fibra presenta características sugerentes de acumulo lipidito. Las fibras mas afectadas corresponden a la porción perifascicular. Algunas con aspecto ragged. Las tinciones ATP asa muestran una distribución normal de fibras tipo I y II	hallazgos sugerentes de miopatía con acumulación lipídica por anomalía mitocondrial requiere Tricrómico de gomori
<b>12.</b>	<b>473</b>	94	Aumento significativo del tejido graso P.A.S positivo a nivel perifascicular. Gran variación del calibre de las fibras que predomina en el borde externo de los fascículos con preservación del espacio intrafascicular. Escasa centralización de núcleos. El hecho mas significativo es la presencia de fibras de gran calibren cuyo sarcolema se observa diferente proporción de tinción púrpura en preparaciones con tricrómico de Gomori que llegan a alcanzar todo el contenido sarcolémico de fibras afectadas	Compatible con miopatía mitocondrial

## CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

13	1182	94	Las fibras musculares muestran un calibre y angulación normal, escasa centralización nuclear, diferenciación de tipos de fibras normales. Ausencia de anomalías de tipo mitocondrial en Tricrómico de gomori. Espacio fascicular normal.	Aspecto morfológico normal
14	104	99		enfermedad de Wernick Hoffmann
15.	397	99	Muestra de un recién nacido. El trocito de músculo aparece de características morfológicas normales.	Aspecto morfológico normal
16.	530		El hallazgo mas relevante en técnica de Tricrómico de Gomori modificado es la presencia de fibras redondeadas de ligero mayor calibre, rojas que destacan respecto del resto del fascículo. Aun cuando el resto de las fibras no adopta la coloración habitual (color turquesa de esta) las fibras, las fibras redondeadas y rojizas son compatibles con “ragged red fibers”.El espacio interfascicular es normal. La morfología de las fibras, su anulación, el número de núcleos en aquellas que no corresponden a las fibras descritas, es normal. No existe infiltración grasa.	Fibras rojas redondeadas de mayor calibre compatibles con miopatía mitocondrial observadas con tricómico de Gomori.

**3.2.3 Protocolos utilizados**

Se realizaron cortes al micrótopo de 5 um de espesor y fueron secados en la estufa a 56°C por media hora.

Se procedió a realizar tinciones de rutina y la tinción tricrómica de Gomori Modificada en de las 16 biopsias seleccionadas. Las tinciones realizadas fueron Hematoxilina- eosina y P.A.S (reacción de ácido periódico de Shiff) y la tinción tricrómica de Gomori Modificada.

*3.2.3.1 Protocolo de la tinción de rutina Hematoxilina-Eosina*

- 1.- desparafinar en xilol 3 cambios de 10 minutos cada uno
- 2.- hidratación por paso de alcoholes descendentes 100° y 95° hasta H2O destilada
- 3.- Tinción en Hematoxilina de Harris por 1 minuto
- 4.- virado en agua corriente por 5 minutos
- 5.- alcohol de 95° 2 cambios
- 6.- tinción en Eosina alcohólica por 3 minutos
- 7.- deshidratación en alcoholes ascendentes 95° y 100°

## CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

- 8.- aclaración en xilol, 3 cambios
- 9.- montaje

*3.2.3.2 Protocolo de la tinción P.A.S*

- 1.- desparafinar en xilol 3 cambios de 10 minutos cada uno
- 2.- ácido periódico al 1% por 10 minutos
- 3.- lavar en agua destilada por 5 minutos
- 4.- colocar en reactivo de Shiff 20 minutos en oscuridad
- 5.- 4 cambios de agua sulfurosa, 5 minutos cada uno
- 6.- lavado en agua corriente y luego agua destilada
- 7.- tinción en hematoxilina de Mayer por 4 minutos
- 8.- lavado en agua corriente, agua destilada
- 9.- deshidratación en alcoholes ascendentes 95° y 100°
- 8.- aclaración en xilol, 3 cambios
- 9.- montaje

*Soluciones*

Solución ácido peryódico

IO<sub>4</sub>H.....1 gr  
 Agua destilada.....100 ml

Solución agua sulfurosa

Metabisulfito de K.....90 ml  
 HCl.....10 ml

*3.2.3.3 Protocolo de técnica de Gomori modificada:*

- 1.- Agua destilada
- 2.- tinción en solución de gomori modificada por 10 minutos
- 3.- paso rápido por ácido acético
- 4.- paso por alcohol de 100°, 3 cambios
- 5.- aclaración con xilol, 3 cambios
- 6.- montaje

*Soluciones*

Tricromico de gomori [7]

- Solution A

Cromótopo 2R.....0.6 gm  
 Fast green FCF.....0.3 gm

## CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

Phosphotungstic acid.....0.6 gm

- Solution B

Ácido acético Glacial ..... 1.0 ml

Agua destilada .....100 ml

- Biopsias fijadas en formalina buffer e incluidas en parafina.

Se realizó 100 ml de solución de tinción de Gomori. Se dividió en 50 cc para dejar el pH original y 50 cc para ajustar el pH. El ajuste se realizó agregando hidróxido de Sodio (NaOH) 1N y regulando con un pHímetro. El pH original de ésta solución fue de 2,2. Se ajustó a 3,4.

- Biopsias sin fijar, en congelación

Se realizaron secciones de esfínter anal congeladas en freezer a -20°C sin fijación, los cuales fueron cortadas al criostato con un grosor de 8 micrones. Una vez cortadas se secaron al aire temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos.

## CAPITULO 4: RESULTADOS

### 4.1 Prueba 1

Tinción con Hematoxilina - Eosina y P.A.S según el protocolo establecido, realizadas en las 16 muestras seleccionadas.

Las 16 placas adoptan la coloración habitual esperada tanto en las fibras musculares como núcleos con las coloraciones Hematoxilina - Eosina y P.A.S, siguiendo los protocolos descritos en Capítulo 3.

En la tinción de Hematoxilina - Eosina: Citoplasma de color característico, rosa-anaranjado, y núcleos color azul oscuro.

En la tinción de P.A.S: se puede ver una variada distribución de glicógeno según patología y generalmente desplazado hacia uno de los extremos.

En ambos casos se puede apreciar una buena conservación de la estructura tisular

### 4.2 Prueba 2

Tinción tricrómica de Gomori modificada realizada en las 16 muestras seleccionadas. Todas se realizaron según el protocolo utilizado, en este caso con una variable: el pH

**TABLA 4.1 Comparación de resultados prueba 1**

<b>Número de biopsia</b>	<b>Con ajuste de pH 3,4</b>	<b>Sin ajuste de pH (pH original 2,2)</b>
1.- 513	Fibras colágenas: verde turquesa muy claro Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
2.- 514	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
3.- 2028	Fibras colágenas: verde turquesa	Fibras colágenas: verde turquesa

## CAPITULO 4: RESULTADOS

	Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras musculares: azuladas y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
4.- 1877	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: la totalidad de las fibras se ven rojizas musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y pocas células musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja
5.- 480 Ver figura 4.1	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojo oscuro Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas claras y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
6.- 2064	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja
7.- 2413	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa, azuladas y rojizas, dando 4 tonos distintos. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja
8.- 155	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa claro y algunos sectores fibras musculares rojizas disparejas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas muy claras. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
9.- 363	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos

## CAPITULO 4: RESULTADOS

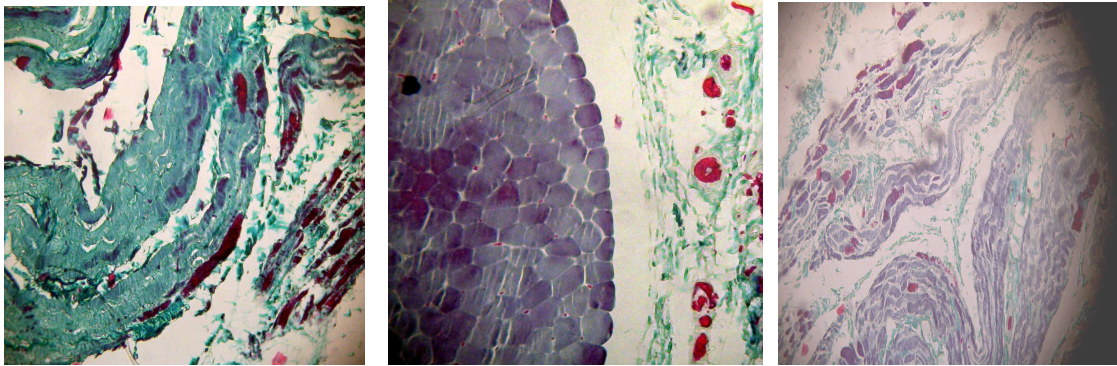
	Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
10.- 569	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
11.- 1004	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas.  Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras colágenas: verde turquesa claro Fibras musculares: azuladas y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
12.- 473	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas.  Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras colágenas: verde turquesa claro Fibras musculares: azuladas y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
13.- 1182	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
14.- 104	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa y pocos sectores rojizos. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas claras. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
15.- 397	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azulado verdoso y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
16.- 530	Fibras colágenas: verde turquesa	Fibras colágenas: verde turquesa

## CAPITULO 4: RESULTADOS

	Fibras musculares: verde turquesa y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente	Fibras musculares: azulado verdoso y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente
--	--	---

Como resultado de la prueba realizada en las 16 placas con la tinción Tricrómica de Gomori Modificada con pH ajustado a 3,4, se observa una coloración de las fibras musculares azulada en la mayoría de las placas. Al realizar la técnica con pH 2,2 se observa una coloración verde turquesa de las fibras musculares.

En todas las placas, las fibras colágenas adquieren un color verde turquesa, mientras que los núcleos y glóbulos rojos y mielina se tiñen rojo.



**FIGURA 4.1. Tinción tricrómica de Gomori biopsia 480. De izquierda a derecha. a) pH 2.2 y ácido acético 0,2%; b) y c) pH 3,4 y ácido acético 0,2%;**

### 4.3 Prueba 3

Tinción tricrómica de Gomori modificada realizada en 5 muestras seleccionadas por diagnóstico de Miopatía mitocondrial. Todas se realizaron según el protocolo utilizado, en este caso con 2 variables: el pH y la concentración de ácido acético.

Se realizaron las siguientes variables:

- Variable 1:

Ácido acético en dos concentraciones al 0,2% y al 0,1%.

- Variable 2:

Solución tricrómica de Gomori modificada con ajuste de pH al 3,4 y solución tricrómica de Gomori modificada sin ajuste de pH (2,2).

## CAPITULO 4: RESULTADOS

La siguiente tabla muestra las variables y las observaciones:

**TABLA 4.2 Comparación de resultados biopsia 473, prueba 3**

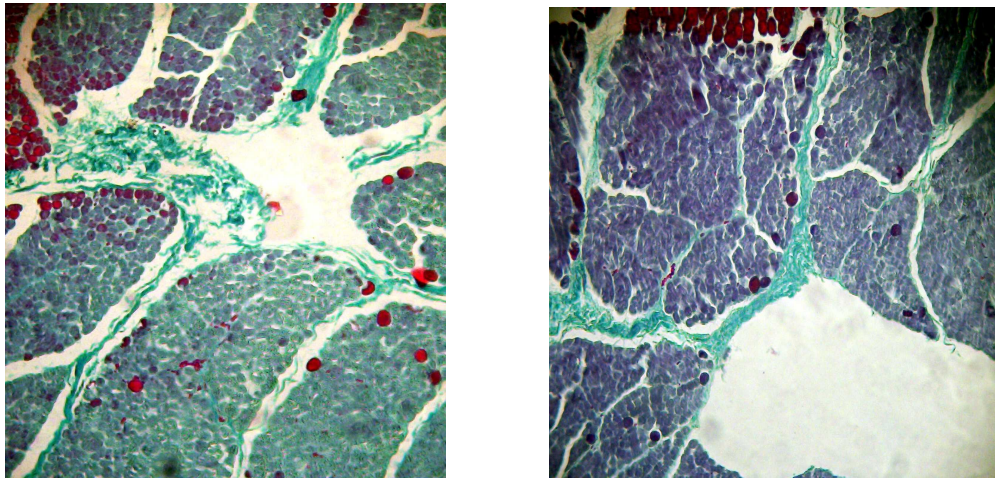
<b>1. Biopsia 473</b>	<b>pH 3,4</b>	<b>pH 2,2</b>
Ácido acético 0,2%	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azulado verdoso y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no se observa Ragged Red Fibers: se observan rojizas. Tinción estable y pareja	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde azulado y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no se observa Ragged Red Fibers: se observan rojizas.
Ácido acético 0,1%	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: predomina el color rojizo. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente <i>Ragged Red Fibers</i> : se observan rojizas.	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: solo fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente <i>Ragged Red Fibers</i> : se observan rojizas.

**TABLA 4.3 Comparación de resultados biopsia 530, prueba 3**

<b>2. Biopsia 530</b>	<b>pH 3,4</b>	<b>pH 2,2</b>
Ácido acético 0,2%	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azulado parejo.  Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente <i>Ragged Red Fibers</i> : se observan rojizas. Distribución del color bastante pareja.	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde azulado y algunos sectores fibras musculares rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente <i>Ragged Red Fibers</i> : se observan rojizas. Distribución del color bastante pareja.
Ácido acético 0,1%	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde azulado parejo. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente Ragged Red Fibers: se observan rojizas.	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azul rojizo Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente Ragged Red Fibers: se observan rojizas.

## CAPITULO 4: RESULTADOS

	En general bastante parejos salvo en zona centro superior derecha.	
--	--	--



**FIGURA 4.2** Tinción tricrómica de Gomori biopsia 530. A la izquierda, variación de pH 2,2 y 4 y ácido acético 0,2%; a la derecha. pH 3,4 y ácido acético 0,2%.

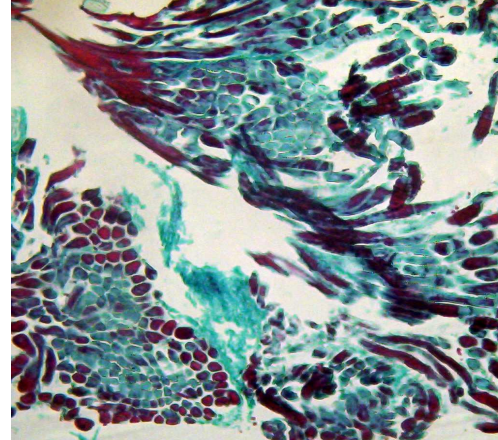
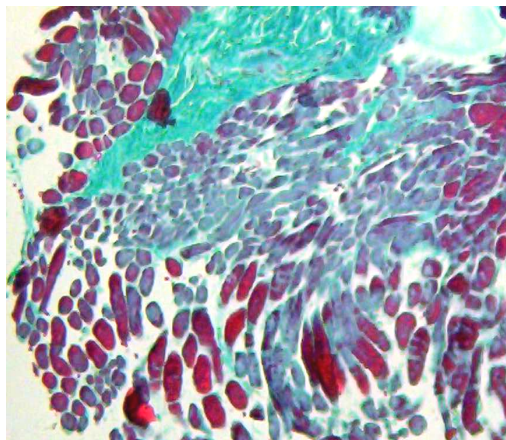
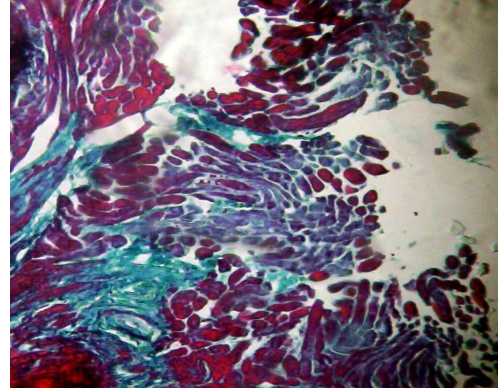
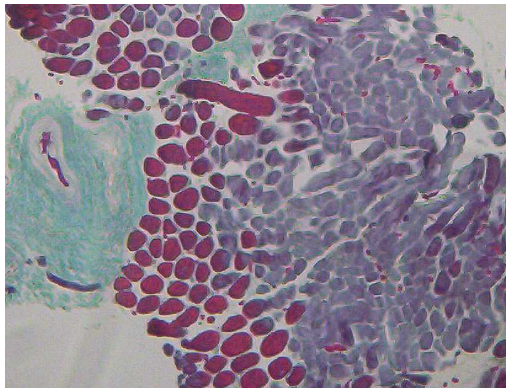
**TABLA 4.4** Comparación de resultados biopsia 363, prueba 3

<b>3. Biopsia 363</b>	<b>pH 3,4</b>	<b>pH 2,2</b>
Ácido acético 0,2%	Fibras colágenas: verde turquesa oscuro Fibras musculares: un porcentaje importante rojizas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente Ragged Red Fibers: se observan rojizas.	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: la gran mayoría rojizas y un pequeño porcentaje azul turquesa Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente Ragged Red Fibers: se observan rojizas.
Ácido acético 0,1%	Fibras colágenas: verde turquesa oscuro Fibras musculares: la gran mayoría rojizas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente Ragged Red Fibers: se observan rojizas.	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: la gran mayoría rojizas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente Ragged Red Fibers: se observan rojizas.

**TABLA 4.5** Comparación de resultados biopsia 1004, prueba 3

## CAPITULO 4: RESULTADOS

<b>4. Biopsia 1004</b>	<b>pH 3,4</b>	<b>pH 2,2</b>
Ácido acético 0,2%	Corte algo grueso Fibras colágenas: verde turquesa oscuro Fibras musculares: aproximadamente la mitad de las fibras rojizas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente Ragged Red Fibers: se observan rojizas.	Fibras colágenas: verde turquesa oscuro Fibras musculares: verde azuladas y algunas rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente Ragged Red Fibers: se observan rojizas.
Ácido acético 0,1%	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente Ragged Red Fibers: se observan rojizas.	Fibras colágenas: verde turquesa oscuro Fibras musculares: verde turquesa igual a las fibras colágenas y fibras en porcentaje importante rojizas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: no evidente Ragged Red Fibers: se observan rojizas.

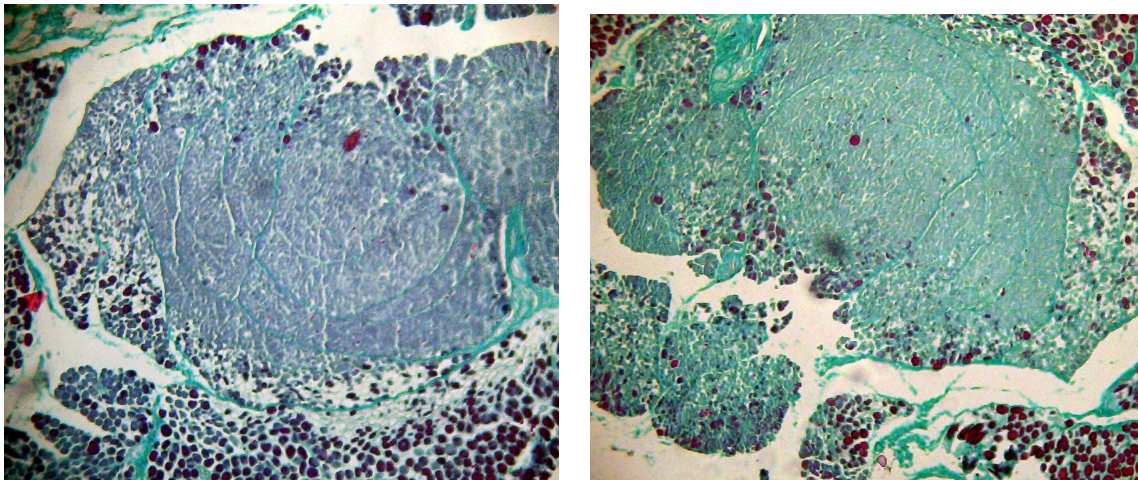


## CAPITULO 4: RESULTADOS

**FIGURA 4.3 Tinción tricrómica de Gomori biopsia 1004.** A la izquierda arriba pH 3,4 y ácido acético 0,2%; a la derecha arriba pH 3,4 y ácido acético 0,1%; A la izquierda abajo pH 2,2 y ácido acético 0,2%; a la derecha abajo pH 2,2 y ácido acético 0,1%

**TABLA 4.5 Comparación de resultados biopsia 2064, prueba 3**

5. 2064	Biopsia	pH 3,4	pH 2,2
Ácido 0,2%	acético	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y fibras rojizas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja Ragged Red Fibers: se observan rojizas.	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa claro y fibras musculares rojas dispersas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja Ragged Red Fibers: se observan rojizas.
Ácido 0,1%	acético	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y fibras rojizas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja Ragged Red Fibers: se observan rojizas.	Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: verde turquesa claro y fibras musculares rojas dispersas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja Ragged Red Fibers: se observan rojizas.



**FIGURA 4.4 Tinción tricrómica de Gomori biopsia 2064.** A la izquierda, variación de pH 3,4 y ácido acético 0,2%; a la derecha. pH 2,2 y ácido acético 0,1%.

## CAPITULO 4: RESULTADOS

La coloración es predominantemente azulada en los casos de tinción a pH 3,4 y verde turquesa similar a las fibras colágenas en los casos a pH 2,2. Como estas muestras seleccionadas presentan Miopatía mitocondrial, estas se observan independiente del pH usado y son distinguibles las fibras rojas rotas o “*ragged red fibers*”

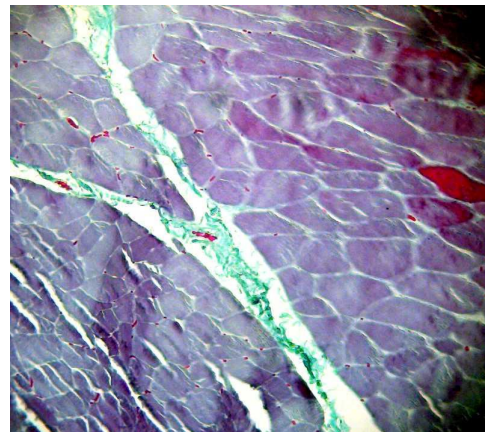
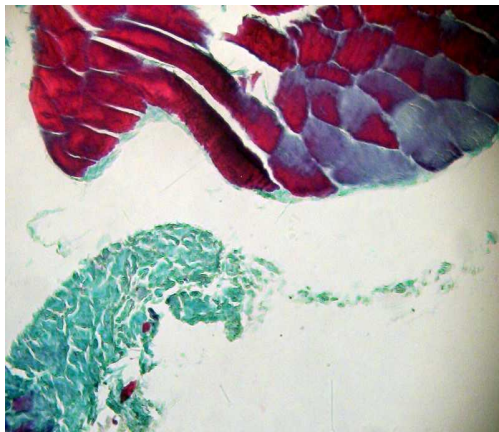
### 4.4 Prueba 4

Se seleccionó aleatoriamente la placa 2413 y se realizó la técnica tricrómica modificada con las variables pH 3,4 y el paso por ácido acético al 0,2%.

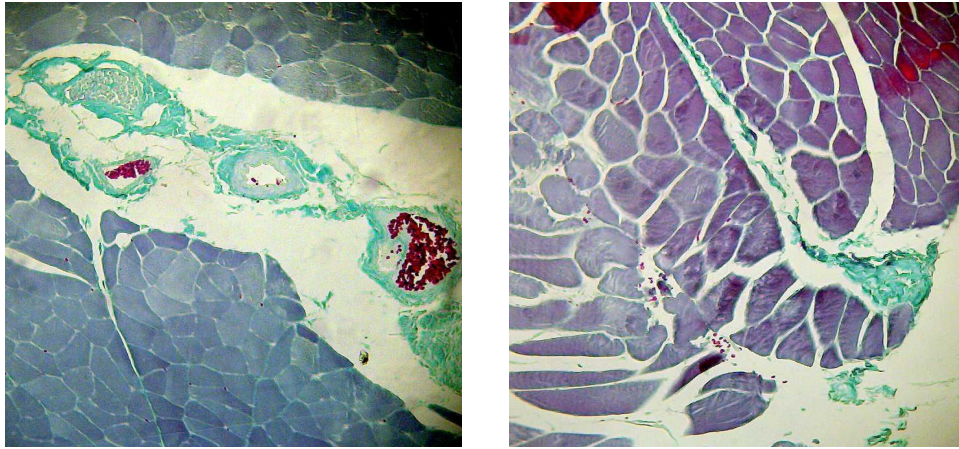
Las observaciones se representan en la siguiente tabla:

**TABLA 4.6 Comparación de resultados biopsia 2413, prueba 4**

<p>A.- Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y fibras rojizas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja Ragged Red Fibers: se observan rojizas.</p>	<p>B.- Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y fibras rojizas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja Ragged Red Fibers: se observan rojizas.</p>
<p>C.- Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y mayor proporción de fibras rojizas. Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja Ragged Red Fibers: se observan rojizas.</p>	<p>D.- Fibras colágenas: verde turquesa Fibras musculares: azuladas y fibras rojizas Núcleos: rojos Glóbulos rojos: rojos Mielina: roja Ragged Red Fibers: se observan rojizas.</p>



## CAPITULO 4: RESULTADOS



**FIGURA 4.4 Tinción tricrómica de Gomori biopsia 2064. A la izquierda arriba, biopsia 2413 A; a la derecha arriba 2413 B; A la izquierda abajo 2413 C y a la derecha abajo 2413 D.**

Se observan las fibras musculares azuladas, así como de fibras musculares de color rojo en ciertas zonas. La coloración rojiza de las fibras musculares esta presente en la totalidad de los casos los casos con mayor o menor intensidad. El patrón de tinción es muy similar en los cuatro cortes seriados.

La fibra colágena se tiñe color verde turquesa y los glóbulos rojos así como los núcleos, rojo brillante.

#### 4.5 Prueba 5

Se realizó la técnica tricrómica de Gomori modificada en una Biopsia en congelación de esfínter anal con las siguientes variables:

- Variable 1:

Ácido acético en dos concentraciones al 0,2% y al 0,1%.

- Variable 2:

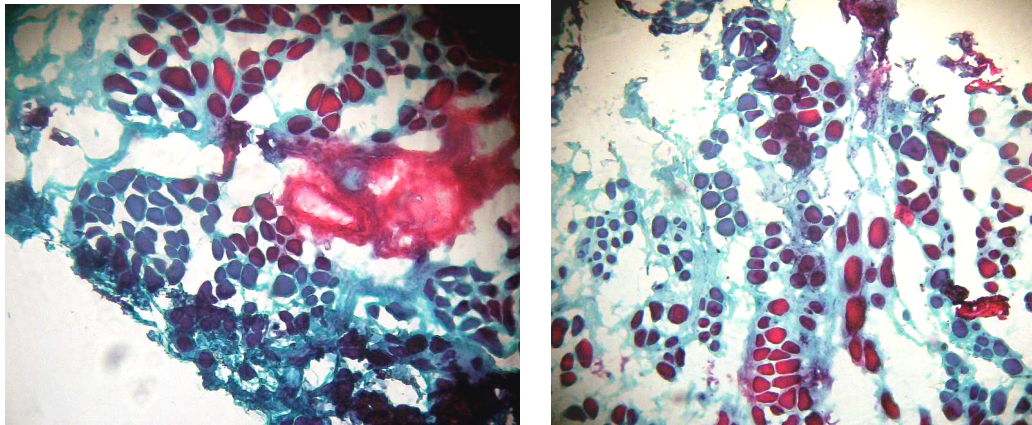
Solución tricrómica de Gomori modificada con ajuste de pH al 3,4 y solución tricrómica de Gomori modificada sin ajuste de pH (2,2).

La siguiente tabla muestra las variables descritas en la tabla 4.7.

#### **TABLA 4.7 Comparación de resultados biopsia de esfínter anal en congelación, prueba 5**

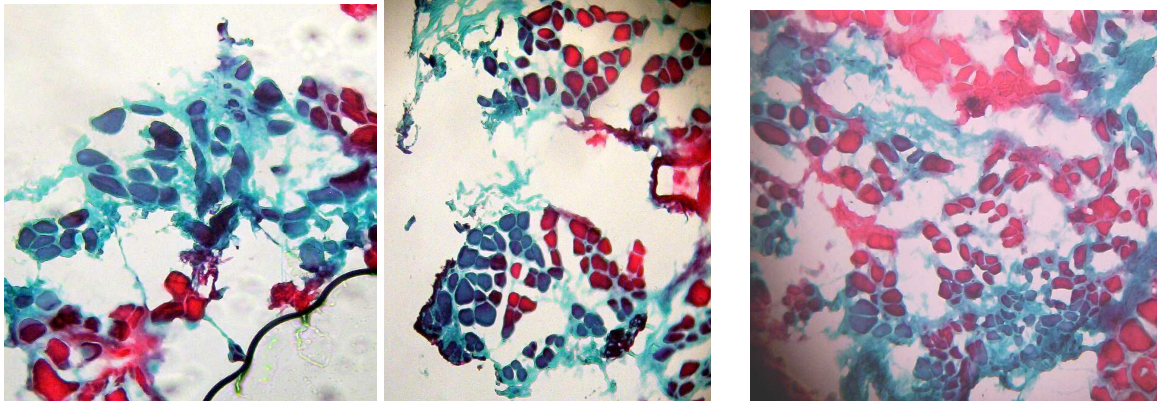
## CAPITULO 4: RESULTADOS

Muestra en congelación	Ácido acético 0.2%	Ácido acético 0.1%
pH 3,4 (ajustado)	Las fibras musculares conservadas se tiñeron de color azulado. La mayor parte de la muestra que presenta vacuolas o está alterada en morfología se tiñó de color rojo intenso. Las fibras colágenas se tiñeron de color verde turquesa. No se evidencian núcleos ni eritrocitos.	Las fibras musculares conservadas se tiñeron de color azulado. La mayor parte de la muestra que presenta vacuolas o está alterada en morfología se tiñó de color rojo intenso. Las fibras colágenas se tiñeron de color verde turquesa. No se evidencian núcleos ni eritrocitos.
pH 2.2 (sin ajustar)	De las fibras musculares que no se tiñeron rojas quedan azuladas en un 50% y verdosas en un 50% de modo aleatorio. Las fibras colágenas se tiñeron de color verde turquesa. No se evidencian núcleos ni eritrocitos.	Se evidencia una sobre tinción. De las fibras musculares que no se tiñeron rojas, el resto se tiñó azuladas en un 50% y verdosas en un 50%, de modo aleatorio. Las fibras colágenas se tiñeron de color verde turquesa. No se evidencian núcleos ni eritrocitos.



**FIGURA 4.5** Tinción tricrómica de Gomori Modificada. A la izquierda, variación de pH 3,4 y ácido acético 0,2%; a la derecha. pH 3,4 y ácido acético 0,1%.

## CAPITULO 4: RESULTADOS



**FIGURA 4.6** Tinción tricrómica de Gomori Modificada. A la izquierda, variación de pH 2,2 y ácido acético 0,2%; a la derecha. 2,2 y ácido acético 0,1%.

La coloración es predominantemente roja en las fibras que se muestran vacuoladas y con morfología alterada y su distribución es aleatoria. De las fibras musculares que adquirieron color azulado, la mayoría presenta un patrón de distribución de color parejo en las fibras conservadas.

La coloración de las fibras colágenas es verde turquesa. No se observan núcleos ni glóbulos rojos.

## **CAPITULO 5: DISCUSION DE LOS RESULTADOS**

### **6.1 Resultados prueba 1**

La correcta coloración con las tinciones Hematoxilina - Eosina y P.A.S nos indica la correcta conservación de las fibras musculares, núcleos, fibras colágenas y glicógeno de las muestras incluidas en parafina.

### **6.2 Resultados prueba 2**

Las variaciones de coloración de las fibras musculares utilizando pH 2,2 y 3,4, nos evidencian una clara diferencia al realizar esta técnica alterando este factor, mientras que la coloración del colágeno, núcleos, glóbulos rojos y mielina no se vería afectado por éste.

Existen en todas las muestras una coloración rojiza en menor o mayor grado. Esto no parece ser mejorado o empeorado al variar el pH, por lo que éste no tendría incidencia en este efecto.

### **6.3 Resultados prueba 3**

Una vez más los resultados nos indican una diferencia de color al utilizar distintos puntos de pH. A Ph 2.2 las fibras musculares adquieren un color muy similar al del colágeno (verde turquesa), mientras que a pH ajustado a 3,4 estas adquieren una coloración más azulada, que ayuda a distinguir el colágeno.

Por otro lado, la variable ácido acético parece no tener mayor relevancia en los resultados, al menos no en la tonalidad azulada o verdosa del citoplasma muscular, ya que en la mayoría de los casos las tonalidades verdosas o azules son independientes de este factor.

### **6.4 Resultados prueba 4**

El hecho de que al realizar la misma técnica en una misma muestra utilizando 4 cortes seriados y que los resultados sean similares en cuanto a tonalidad del color y distribución de fibras rojas, nos indicaría que la distribución de estas fibras esta predeterminada por factores probablemente externos a la técnica. La única diferencia visible en la intensidad de la coloración se puede deber a una diferencia en el grosor de los cortes más que a la técnica en sí misma.

### **6.5 Resultados prueba 5**

En este caso, una vez más, el paso por ácido acético no produce diferencias visibles por lo que su mayor o menor concentración no produciría efectos importante en la coloración de las fibras musculares ni colágenas ni de la coloración que adquieren las otras estructuras.

## CAPITULO 5: DISCUSION DE LOS RESULTADOS

### **6.6 Discusion general**

El hecho de que la distribución del color en las fibras conservadas es uniforme, nos daría otra señal de que el paso por el agua acetificada no es la causa de una mala distribución del color. Sería entonces un factor externo a la técnica de Gomori, atribuible a la manipulación del músculo en etapas previas a la coloración, por ejemplo al momento de extraer la muestra, sujeción con pinzas, cortes con bisturí. Las fibras musculares sufren atrición. Esto es inferible debido a que morfológicamente, las fibras que se tiñen repetidamente rojizas en cortes seriados, corresponderían a zonas que han sido manipuladas y las fibras musculares muestran una morfología anormal. Esto produciría que, al tratarse de fibras musculares fijadas en formalina, se revele las zonas que han sufrido trauma haciendo que la técnica histoquímica tiña diferencialmente estas zonas alteradas.

La coloración de las fibras colágenas parece no verse alterada por las variaciones ni de pH ni de paso por agua acetificada.

La predominante coloración roja en los cortes puede corresponder a una inadecuada congelación del espécimen la cual fue realizada en freezer y no en nitrógeno. Este hecho tendría consecuencias negativas con respecto a la buena conservación de la morfología, produciéndose las vacuolas y alteraciones del tejido muscular observables en las fotografías. Estas corresponden a la descripción morfológica de la congelación no instantánea, dando aspecto de “queso suizo”. Como se indica en la literatura, una mala fijación produce una mala calidad de tinción (ver cap. 2.4.2)

La coloración rojiza de las fibras musculares en general, podría deberse a un cambio de afinidad de los colorantes por las fibras musculares. Se sabe que el ácido fosfotúngstico es un reactivo que es pH dependiente. Sobre Ph 2 cambia su estructura. Los colorantes citoplasmáticos, el ácido fosfotúngstico y el cromótopo 2R se verían alterados por variaciones de pH, dando tonalidades diferentes.

## CAPITULO 7: CONCLUSIONES

Se utilizó biopsias musculares para optimizar la técnica de Gomori de Modificada. Se realizó diversas pruebas modificando factores como el pH y el paso por agua acetificada y el tipo de muestras. Los resultados indican que el ajuste de pH tiene una relación directa con la coloración del citoplasma de las células musculares, obteniendo una tonalidad mas azulada. A pH más ácido el efecto es una coloración verde turquesa. Esto tiene relevancia ya que el color verde es muy similar cuando las fibras se tiñen a un pH 2.2. El ajuste a pH 3,4 cumpliría la función de dar tonalidad, al menos en los casos de biopsias en parafina. En las muestras en congelación, el factor pH parece no tener mayor relevancia.

La coloración rojiza de ciertas células y fibras musculares en vez del tono verde - azulado, está presente en la mayoría de las muestras musculares. Esto es causado por un factor ajeno a la técnica de Gomori, en el caso de las fibras musculares fijadas en formalina e incluidas en parafina. En el caso de las biopsias sin fijar en congelación esto no puede ser completamente demostrable ya que también existe presencia de fibras rojas pero que se relacionan al efecto de vacuolización por congelación lenta.

Afortunadamente, las miopatías mitocondriales siguen siendo diagnosticables debido a que por lo general la distribución de estas fibras rojas esta en la periferia y muestran morfología alterada, distinta de, por ejemplo, las fibras rojas melladas que se presentan mas bien aisladamente y con formas particulares de distribución del color rojo.

Variaciones en las condiciones ideales para el tratamiento del músculo como fijación, manipulación, extracción lipídica o mala calidad de la congelación altera la calidad de la tinción. Estos factores que afectan la normalidad del citoplasma muscular son ajenos a la técnica histoquímica *per se*.

Las biopsias pueden ser realizadas en casos con fijación y fijadas en formalina, teniendo como inconveniente las fibras rojas no patológicas que ya describimos pero que pueden ser identificadas por el patólogo, dependiendo de su expertiz. Si se cuenta con los medios adecuados de congelación es recomendable realizar la técnica como lo indican los autores originalmente.

# REFERENCIAS

## Libros

1. Adams, Raymond D. Principios de neurología. 7a. ed. McGraw Hill Interamericana, 2002.
2. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology (Washington D. C.). Advanced laboratory methods in histology and pathology. Ulrika V. Mikel. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology. Washington D.C. 1994
3. Biochemical Reagents Kits “for life science research”, Sigma general catalog. 2006-2007
4. Certistanin and microscopy dyes. Merk. 4th edition. Germany, 1998.
5. Dubowitz, Victor. Muscle Disorders in Childhood. 1st Edition. W. B. Saunders. 1978
6. Dubowitz, Victor. Muscle biopsy: a modern approach. Sauders. London 1973
7. Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Métodos histotecnológicos. Editado por Edna B. Prophet. [et al.]. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP). Washington D.C. 1995.
8. Gartner, Leslie P. Ph. Atlas color de Histología D. 3ª edición. Médica Panamericana, Buenos Aires. 2003.
9. Junqueira L.C. Histología básica. Masson 6a. ed Barcelona. 2005
10. Robbins, Stanley L. Patología estructural y funcional. 5ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 1987.
11. Stevens, Alan. Histopatología básica: Atlas y texto en color. 4a. ed. Elsevier. Madrid. 2003
12. Wheater's Basic histopathology. A colour atlas and text. 3th ed. Burkitt. [et. al.]. Churchill Livingstone. New York. 1996
13. Wheater's histología funcional. Texto y atlas en color. 4a. ed editado por Barbara Young. [et al.] Harcourt. Madrid. 2000.
14. Zarranz, Juan J. Neurología. Harcourt & Brace, Madrid. 1998.

## CAPITULO 1: INTRODUCCION

### **Publicaciones**

15. Engel & Cunningham. Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh frozen biopsy specimens. Neurology, Vol.13. 1963. pp.921-923.

16. Quintarelli, M. Bellocci, and R. Geremia. On phosphotungstic acid staining. Selectivity of the staining reaction. Vol. 21, No. 2, pp 155-160. 1972

### **Paginas Web**

17. [www.aeped.es](http://www.aeped.es)

18. [www.anapath.necker.fr](http://www.anapath.necker.fr)

19. <http://anatpat.unicamp.br>

20. [www.bvsalud.org](http://www.bvsalud.org)

21. [www.ebsco.com](http://www.ebsco.com)

22. [www.emedicine.com](http://www.emedicine.com)

23. <http://enciclopedia.us.es>

24. [www.fonama.org](http://www.fonama.org)

25. [www.hoslink.com](http://www.hoslink.com)

26. [www.histosearch.com](http://www.histosearch.com)

27. [www.inchem.org](http://www.inchem.org)

28. [www.institutferran.org](http://www.institutferran.org)

29. [www.jhc.org](http://www.jhc.org)

30. [www.merck.de](http://www.merck.de)

31. [www.neuro.edu](http://www.neuro.edu)

32. [www.neuropathologyweb.org](http://www.neuropathologyweb.org)

33. [www.neuro.wustl.edu](http://www.neuro.wustl.edu)

## CAPITULO 1: INTRODUCCION

34. <http://physchem.ox.ac.uk>

35. [www.pubmedcentral.gov](http://www.pubmedcentral.gov)

36. [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

37. [www.scn.es](http://www.scn.es)

38. [www.serva.de](http://www.serva.de)

39. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

40. <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/stainindex.htm>

41. [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)