
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

“CONTRIBUCIÓN EN PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DE LABORATORIO
PARA PROPORCIONAR INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA EN
EL DIAGNÓSTICO DE MIOPATÍAS MITOCONDRIALES Y METABÓLICAS”

QUE PRESENTA

DANIELA TORRES HERNÁNDEZ
2153061148

ASESORAS

V



M.M.S Ruth Soto Castor
Asesora Interna UAM-X
No. Econ. 17064



Biól. Francisca Fernandez
Valverde
Asesora Externa

Ciudad de México, 29 de mayo de 2022

RESUMEN:

Actualmente las miopatías genéticas han tomado importancia debido a que con el avance de la ciencia y tecnología se ha enriquecido la mejor comprensión subyacente de la enfermedad neuromuscular, son diversos los genes implicados en las miopatías de causa genética, por lo que se clasifican en fenotipos clínicos para particularizar el diagnóstico (Shieh P, 2013), en la realización de este servicio social se estudiaron las de tipo mitocondrial y metabólicas, estas son enfermedades raras y poco frecuentes en la práctica clínica, es por eso que comúnmente son diagnosticadas y estudiadas en centros de investigación. El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" es una de las pocas instituciones a nivel internacional que de forma exclusiva se dedica a la investigación, enseñanza, diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades neuromusculares. La biopsia muscular en fresco o fijada de forma física, analizada en microscopía óptica es una herramienta útil en este diagnóstico. En la realización de este servicio social se aplicaron tinciones para encontrar hallazgos específicos para contribuir en el diagnóstico, para descartar otras causas de enfermedades neuromusculares (miopatías inflamatorias) y observar la estructura de las fibras musculares tales como Hematoxilina y Eosina (H y E) y Trómicoma de Gomori, también se aplicaron tinciones para valorar reacciones enzimáticas como NADH que valora el complejo II y la tinción de COX para valorar el complejo IV de la cadena de respiración mitocondrial.

Palabras clave: **enfermedad neuromuscular, miopatía metabólica
miopatía mitocondrial, biopsia muscular, microscopía óptica**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES DEL PROGRAMA	5
3. UBICACIÓN GEOGRAFICA	5
4. OBJETIVO GENERAL	5
5. OBJETIVOS PARTICULARES	¡Error! Marcador no definido.
6. ESPECIFICACIONES Y FUNDAMENTO DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS	5
7. IMPACTO DE LAS ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL	9
8. APRENDIZAJE Y HABILIDADES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO	9
9. FUNDAMENTO DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL	9
10. REFERENCIAS	10

1. INTRODUCCIÓN

En el Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” se realiza investigación de las diversas alteraciones del sistema nervioso periférico y central aplicando técnicas para contribuir en el conocimiento de las neurociencias, sus áreas de trabajo son Microscopía Electrónica, Histopatología y Patología Vascul ar.

La finalidad de este informe es dar a conocer las actividades realizadas durante el Servicio Social prestado por la alumna en El Laboratorio de Patología Experimental del INNN durante un periodo de seis meses.

Mediante la realización del Servicio Social en el Laboratorio de Patología Experimental se contribuyó en técnicas histológicas con las que se proporcionó el diagnóstico pronto y verídico a pacientes con sospecha clínica de miopatías mitocondriales y metabólicas. De esta forma, la alumna adquirió y aplicó conocimientos que le favorecieron el desarrollo de su formación profesional y simultáneamente se le proporciono un diagnóstico oportuno de miopatías mitocondriales y metabólicas a pacientes del sector salud.

2. ANTECEDENTES DEL PROGRAMA

El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” es una de las pocas instituciones a nivel internacional que de forma exclusiva se dedica a la investigación, enseñanza, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cerebrales desde el nivel molecular y hasta el ámbito social. Al tratarse de una institución líder en México, con reconocimiento internacional representa una oportunidad única para desarrollar el servicio social en sus instalaciones. En el Laboratorio de Patología Experimental se realiza investigación básica y clínica de las alteraciones del sistema nervioso periférico y central aplicando técnicas actualizadas para contribuir en el conocimiento de las neurociencias, sus áreas de trabajo son Microscopía Electrónica, Histopatología y Patología Vascul ar.

3. UBICACIÓN GEOGRAFICA

Las actividades se realizaron en el Laboratorio de Patología Experimental del área de investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. El INNN se encuentra ubicado en la Avenida Insurgentes Sur 3877, Colonia La Fama en la Alcaldía Tlalpan de la Ciudad de México.

4. OBJETIVO GENERAL

Mediante la realización del Servicio Social en el Laboratorio de Patología Experimental se contribuyó en técnicas histológicas con las que se proporcionó el diagnóstico pronto y verídico a pacientes con sospecha clínica de miopatías mitocondriales y metabólicas. De esta forma, se adquirieron y aplicaron conocimientos que favorecieron a la alumna en el desarrollo de su formación profesional y simultáneamente se le proporciono un diagnóstico oportuno de miopatías mitocondriales y metabólicas.

5. ESPECIFICACIONES Y FUNDAMENTO DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS

Se contribuyó en procedimientos técnicos de laboratorio que proporcionaron información complementaria en el diagnóstico de 23 pacientes con sospecha de miopatías mitocondriales y 38 pacientes con sospecha de miopatías metabólicas. La duración de

las actividades fue de 480 horas distribuidas en un periodo de seis meses, iniciando el 29 de noviembre de 2021 y terminando el 29 de mayo de 2022.

Para el diagnóstico de enfermedades neuromusculares se requirió una muestra de biopsia muscular, el tejido fresco se fragmentó en tres partes con ayuda de una hoja de bisturí y después se procesó en microscopía electrónica, técnica histopatológica y microscopía óptica para tejido nervioso.

5.1 Microscopía electrónica para músculo.

Para el procesamiento ulterior mediante microscopía electrónica uno de los fragmentos de cada biopsia fue segmentado en muestras pequeñas, posteriormente se fijó de forma química mediante la inmersión en glutaraldehído al 2% en solución buffer, las fijaciones duraron como mínimo 2 días y como máximo 2 semanas (Dubowitz *et al.*, 2013). Después se aplicó una segunda fijación en tetróxido de Osmio al 1%, se lavó en ácido de cacodilato y se deshidrató en acetona. Posteriormente se incluyó en resina sintética EPON. Después de la polimerización y desmolde de las cápsulas de inclusión se tallaron los bloques y fueron seccionados en un microtomo en cortes semifinos de 1 μm de grosor, o en cortes ultrafinos de 60 nm de grosor (Gracia-Bragado *et al.*, 205). El primer corte se recogió con un portaobjetos de cristal y fue teñido con azul de Toluidina para ser evaluado en microscopía óptica; los demás cortes fueron recogidos en rejillas de cobre para ser teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo, posteriormente se analizaron en microscopio electrónico de transmisión.

5.2 Técnica histopatológica para músculo.

Otro de los segmentos restantes de cada biopsia se fijó físicamente mediante la congelación en isopentano 2 metilbutano enfriado en Nitrógeno líquido, cuando la muestra se encontraba congelada se montó en un soporte de corcho con Tissue Tek y se seccionara en un criostato previamente aclimatado a -20°C en cortes de 5 a 8 μm de grosor (Weller, 1984). El primer corte fue teñido con azul de Toluidina y se evaluó en microscopía óptica, los demás cortes se sometieron a técnicas histológicas, técnicas inmunohistoquímicas y técnicas histoquímicas.

El tercer segmento de la biopsia se fijó de forma química mediante la inmersión en paraformaldehído al 4% durante 24 horas y será incluyó en parafina. Posterior a la fijación la muestra se cortó en un microtomo a 5 μm de grosor; los cortes se recogieron en portaobjetos de vidrio y fueron almacenados. Antes de realizar el procedimiento de tinción los cortes fueron desparafinados e hidratados (Weller, 1984), una vez hidratados se les aplicaron técnicas histológicas y técnicas inmunohistoquímicas.

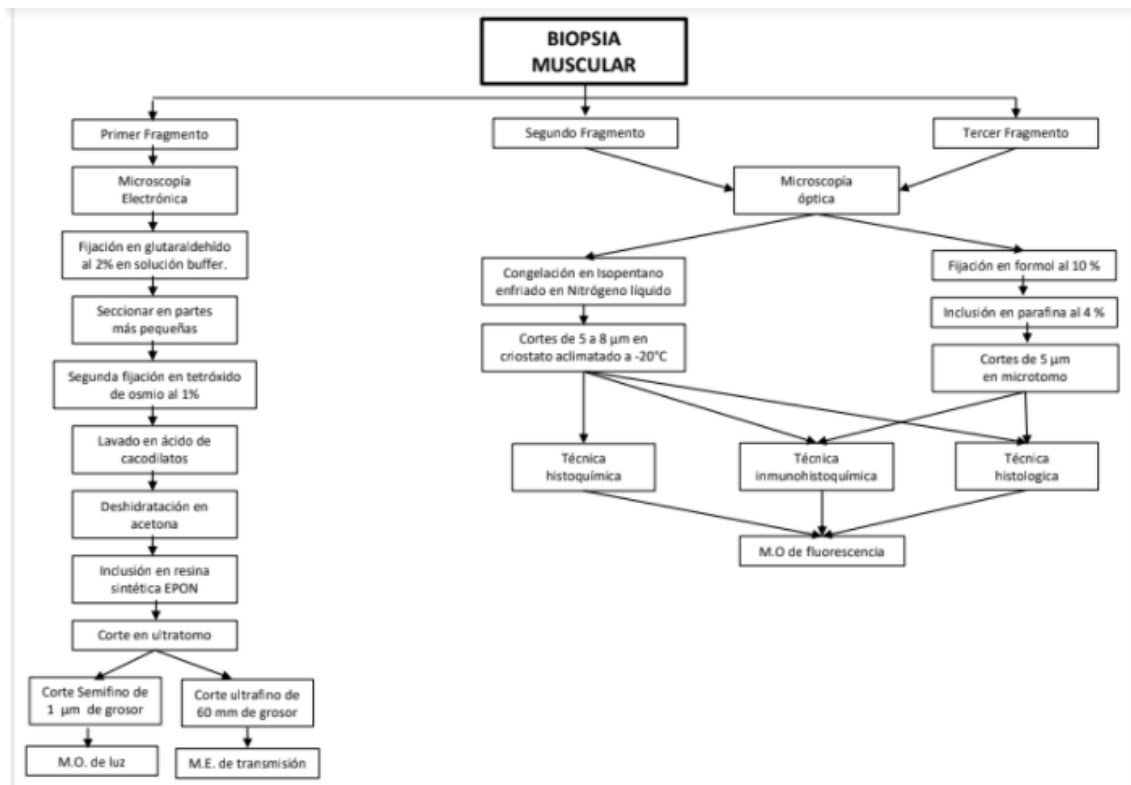
5.3 Microscopía óptica para tejido nervioso: técnica histológica Rojo Congo Rojo Congo de Bennhold para Amiloide.

La muestra se fijó químicamente en formalina neutra estabilizada al 10%, posteriormente a la fijación se incluyó en parafina y se cortaron en un microtomo, los cortes se recogieron en portaobjetos de vidrio y fueron almacenados. Los cortes se desparafinaron de forma típica y se hidrataron en serie descendente de alcohol, posteriormente se realizó el proceso de tinción respetando los períodos indicados (Tabla 1), después de cada paso de tinción los cortes se escurrieron absolutamente por método de goteo para evitar el arrastre de soluciones.

Tabla 1. Periodos del proceso de tinción en la técnica histológica Rojo Congo

Sustancia	Tiempo
Agua destilada	1 minuto
Solución de hematoxilina modificada según Gill II o Solución de hematoxilina modificada según Gill III	5 minutos
Agua corriente	5 minutos
Reactivo 1 (solución de Rojo Congo)	10 minutos
Agua corriente	5 minutos
Reactivo 2 (solución de KOH)	30-40 segundos
Agua corriente	5 minutos
Etanol 96 %	30 segundos
Etanol 96 %	30 segundos
Etanol 100 %	1 minuto
Etanol 100 %	1 minuto
Xileno	5 minutos
Xileno	5 minutos

Tabla 2. Diagrama de la metodología que será aplicada.



6. IMPACTO DE LAS ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

Durante la ejecución de este servicio social la alumna reforzó su formación, ya que se le proporcionó acceso a un laboratorio de patología experimental en el cuál adquirió habilidades, competencias y conocimientos que le permitieron participar en el diagnóstico de miopatías mitocondriales y miopatías metabólicas, entre ellas distrofia muscular de Duchenne, atrofia muscular espinal y síndrome de Pearson.

7. APRENDIZAJE Y HABILIDADES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO

Al realizar este servicio social la alumna adquirió los conocimientos y habilidades para preparar reactivos, realizar cortes en microtomo y criostato, y aplicar técnicas de microscopía electrónica para musculo, técnica histopatológica para musculo y técnica histológica Rojo Congo Rojo Congo de Bennhold para Amiloide, además de preparar sustancias y reactivos necesarios para el procesamiento de las muestras y documentar los hallazgos entrados.

8. FUNDAMENTO DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

Este servicio social por actividades relacionadas con la carrera se llevó a cabo para que la estudiante adquiriera conocimientos teóricos y prácticos sobre la aplicación de las técnicas más relevantes en el diagnostico de enfermedades neuromusculares, como la microscopía óptica permite conocer la microestructura de las muestras biológicas mediante la interacción con los fotones, de esta forma permite la comprensión de la estructura microscópica de las células, tejidos y órganos, y simultáneamente relaciona la morfología con la función. Actualmente la microscopía electrónica de transmisión es utilizada como una solución diagnóstica para enfermedades específicas que no pueden identificarse con los métodos de diagnóstico estándar (molecular o microscopía óptica). Así mismo, la biopsia y su interpretación en la histopatología es de suma importancia para determinar un tratamiento, y paralelamente permite evitar las consecuencias mortales de estos mismos.

9. REFERENCIAS

Dubowitz V., C. Sewry, Oldfors A. 2013 Muscle biopsy. A practical approach. Fourth edition. Philadelphia. Saunders Elsevier

Gracia-Bragado F. 2015. La biopsia muscular. Aspectos prácticos. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España. Vitoria-Gasteiz: Sociedad Española de Anatomía Patológica

Schwartz M., J Vissing. 2002. Paternal Inheritance of mitochondrial DNA. The New England Journal of Medicine 347

Shieh P., 2013 Muscular dystrophies and other genetic myopathies. Neurol Clinic Nov 1009

Weller R. 1984. Muscle biopsy and the diagnosis of muscle disease. Recent advances in histopathology. New York: Curchill Livingstone