

# Miositis osificante progresiva: Ultraestructura, bioquímica e histoquímica de músculo macroscópicamente sano

J. GARMENDIA\*, S. H. TORRES\*, N. HENÁNDEZ\*, H. J. FINOL\*\* y A. MARTÍNEZ CONDE\*\*\*

\* Sección de Adaptación Muscular, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. \*\* Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. \*\*\* Hospital Ortopédico «San Juan de Dios».

**Resumen.**—Se estudió un caso de miositis osificante progresiva en una niña de 13 años, a la cual se le tomó una muestra de músculo gastronecmio lateral, aparentemente no afectado, en el curso de una intervención quirúrgica ortopédica. La muestra se procesó mediante métodos histológicos, histoquímicos, bioquímicos, inmunocitoquímicos y ultraestructurales. Se encontró un predominio de fibras musculares tipo I (83%) con alta capacidad oxidativa y baja capacidad glicolítica. Las fibras del tipo II eran pequeñas (área promedio  $2.084 \text{ Um}^2$ ) y mostraron otros signos de atrofia al examen ultraestructural. La densidad capilar fue relativamente alta, (573) siendo normal el índice capilar/fibra (1,76). Sin embargo, algunos capilares se mostraron engrosados y con la luz ocluida, con la tinción de amilasa-PAS, lo cual fue corroborado con la microscopía electrónica, donde se vio la membrana basal engrosada, e inclusive algunos capilares totalmente degenerados. No se encontró reacción de inmunofluorescencia con las globulinas anti-IgG ni anti-IgM en los cortes de músculo. El espacio intersticial se encontró agrandado. Se concluye que no hay evidencias de la participación de un mecanismo autoinmune en la miositis osificante progresiva, que existe un daño capilar y alteración de las fibras musculares, aún en el músculo que no manifiesta a simple vista proceso de osificación.

## MYOSITIS OSSIFICANS PROGRESSIVA. ULTRASTRUCTURE, BIOCHEMISTRY AND HISTOCHEMISTRY OF APPARENTLY NORMAL MUSCLE

**Summary.**—During an orthopedic operation a sample of the apparently normal lateral gastronecmius muscle was taken from a 13 year old female patient affected by myositis ossificans progressiva. The muscle sample was analyzed by light, electron and fluorescence microscopy, and some enzymes were assayed. Muscle fibers were classified by the adenosintriphosphatase reaction. The percentage of type I fiber was high (83%). Atrophy was found in type II fibers as shown by small mean area ( $2.084 \text{ Um}^2$ ) and some ultrastructural features as infoldings of the sarcolemma. Capillary density was high (573 capillaries/mm<sup>2</sup>), and capillaries per fiber index was normal (1.76), as were oxidative enzymes. However many capillaries were occluded, with thick basal membrane and abnormal endothelial cells and pericytes. No immunofluorescence was found with anti IgG or anti IgM in the muscle fibers. Interstitial spaces in the cross section of the muscle were enlarged. In conclusion, no evidence of autoimmune involvement was found in myositis ossificans progressiva, but alterations of capillaries and muscle fibers were found in a muscle apparently not affected yet by the ossification process.

### Correspondencia:

Dra. JENNY GARMENDIA  
Instituto de Medicina Experimental  
Facultad de Medicina  
Universidad Central de Venezuela  
Sabana Grande  
1050 Caracas

## INTRODUCCIÓN

La miositis osificante progresiva o fibrodysplasia osificante progresiva es una enfermedad hereditaria poco frecuente, autosómica dominante con penetrancia completa pero expresividad variable (1). Muchos casos pueden presentarse como mutación genética re-

ciente. Se caracteriza por proliferación exagerada del tejido conectivo en el tejido intersticial del músculo esquelético, fascias, tendones, ligamentos y aponeurosis, con progresión a la calcificación y formación de hueso. Fundamentalmente afecta la musculatura dorsal del tronco y proximal de las extremidades, sin comprometer lengua, diafragma, esfínteres musculares o corazón. Un 75 a 90% de los casos pueden cursar con anomalías congénitas como microdactilia de pulgares y hallux, clinodactilia, deformidad de orejas, sordera y ausencia de dientes. Los estudios acumulativos demuestran una incidencia igual para hombres y mujeres (2). La enfermedad se manifiesta en la infancia, generalmente antes de los cuatro años.

Aún no se han aclarado los cambios patológicos iniciales, ni los mecanismos celulares básicos de esta enfermedad. La mayoría de los estudios parecen apuntar hacia una alteración del tejido conectivo que afecta secundariamente al músculo. Sin embargo, algunas observaciones histoquímicas sugieren que el tejido muscular está intrínsecamente alterado antes de ser invadido por el tejido conectivo (3-5). En relación a esta última hipótesis y en vista a los pocos estudios publicados, en el presente trabajo se realizó el estudio de la ultraestructura y de algunas reacciones histoquímicas y bioquímicas en una muestra de músculo gastrocnemio lateral, sin alteraciones macroscópicas, proveniente de una paciente con miositis osificante. Igualmente se realizaron estudios inmunocitoquímicos para descartar la posible intervención de un proceso inmunológico.

En la literatura nacional hasta el presente sólo se han publicado las descripciones clínicas e histológicas de tres casos de miositis osificante (6-8).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomó una biopsia a cielo abierto del gastrocnemio lateral izquierdo, durante una intervención quirúrgica ortopédica de una paciente de 13 años, con diagnóstico de miositis osificante desde los 2 años de edad. La muestra se dividió en tres fragmentos: El primero, para el estudio histoquímico e inmunocitoquímico se incuyó en OCT® (Tissue Tex II), se congeló en isopentano enfriado en nitrógeno líquido y se guardó en congelador a -80°C hasta su procesamiento. El segundo fragmento se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido e igualmente se mantuvo a -80°C para los estudios bioquímicos. El último fragmento se procesó según los métodos convencionales de microscopía electrónica de transmisión.

Al primer fragmento se le practicaron cortes transversales de 10  $\mu$ m en un criostato a -20 °C. Posteriormente se procedió a realizar las siguientes técnicas:

1. Tinción con hematoxilina-eosina para el estudio histológico.

2. Reacción histoquímica de la adenosinatrifosfatasa (ATPasa) según la técnica de Brooke y Kaiser (9). Los cortes se preincubaron a pH 10,3, 4,8 y 4,6 y 4,37. La clasificación de las fibras se hizo comparando láminas de cortes sucesivos a distintos pH de preincubación, en tipo I, IIA y IIB.

3. Tinción con el reactivo de Schiff, previa digestión del glucógeno con  $\alpha$ -amilasa o técnica de  $\alpha$ -amilasa-PAS (10). Estos cortes fueron fotografiados para cuantificar capilares y medir el área de las fibras por planimetría, e determinaron los siguientes parámetros: índice capilar (N.º de capilares por fibras); densidad capilar (N.º de capilares/mm<sup>2</sup>); N.º promedio de capilares adyacentes a cada tipo de fibra; relación área de fibra/capilar (área promedio de cada tipo de fibra entre el número de capilares adyacentes a ese tipo de fibra).

4. Reacciones histoquímicas para la nicotinamida adenina dinucleótido reducido diaforasa (NADH-d) (11) y la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GPDH). (12).

5. Inmunofluorescencia directa para IgG e IgM humanas (13).

6. Test de naranja de acridina (14).

Con el segundo fragmento se preparó un homogenizado en solución amortiguadora de fosfato de potasio. Se determinó la actividad de las enzimas (B-hidroxiacilCoA deshidrogenasa (HAD), Citrato sintetasa (CS) y Hexoquinasa (HK), usando el método fluorométrico de Lowry y Passoneau (15), expresándose los resultados en  $\mu$ moles/min x g de músculo en peso húmedo.

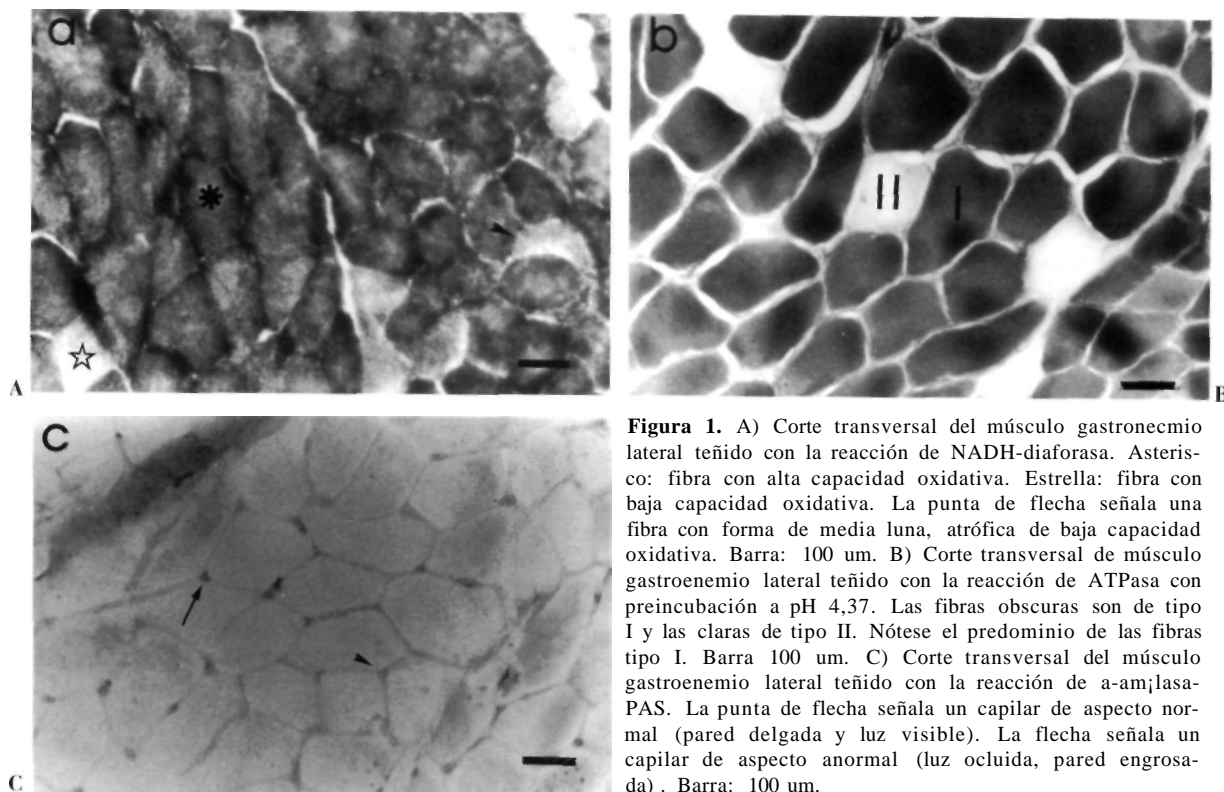
Con el tercer fragmento se realizó microscopía electrónica de transmisión utilizando técnicas convencionales.

## RESULTADOS

En los cortes teñidos con hematoxilina-eosina se pudo observar infiltrado mononuclear moderado, ensanchamiento o aumento de los espacios intersticiales, degeneración hialina en menos del 1% de las fibras, abundantes capilares dilatados y aumentados de tamaño. En la reacción histoquímica para NADH-d predominaron células con alta capacidad oxidativa (capacidad alta 75%, intermedia 15%, baja 10%). Normalmente las fibras de baja capacidad oxidativa son las de mayor tamaño, sin embargo, muchas de ellas eran muy pequeñas, aplanadas o triangulares, lo cual es signo de atrofia (fig. 1A).

En la reacción histoquímica para  $\alpha$ -GPDH predominaron las fibras con baja capacidad glicolítica (baja capacidad 67%, media 11%, alta 22%). Igualmente dentro de las fibras con alta capacidad glicolítica se apreciaron fibras atroficas.

Con el test de naranja de acridina se observaron núcleos escasos alrededor de las fibras que probablemente correspondan a un infiltrado inflamatorio



**Figura 1.** A) Corte transversal del músculo gastrocnemio lateral teñido con la reacción de NADH-diaforasa. Asterisco: fibra con alta capacidad oxidativa. Estrella: fibra con baja capacidad oxidativa. La punta de flecha señala una fibra con forma de media luna, atrófica de baja capacidad oxidativa. Barra: 100  $\mu$ m. B) Corte transversal de músculo gastrocnemio lateral teñido con la reacción de ATPasa con preincubación a pH 4,37. Las fibras oscuras son de tipo I y las claras de tipo II. Nótese el predominio de las fibras tipo I. Barra 100  $\mu$ m. C) Corte transversal del músculo gastrocnemio lateral teñido con la reacción de a-amilasa-PAS. La punta de flecha señala un capilar de aspecto normal (pared delgada y luz visible). La flecha señala un capilar de aspecto anormal (luz ocluida, pared engrosada). Barra: 100  $\mu$ m.

leve a moderado. No se evidenciaron lesiones en las fibras musculares con esta técnica.

La clasificación de las fibras según la ATPasa fue: tipo I, 83%; tipo IIA, 5% y tipo IIB, 12% (fig. 1b).

El área correspondiente a cada tipo de fibra fue: Tipo I: 3267  $\mu$ m<sup>2</sup>; tipo IIB: 2084 ( $\mu$ m<sup>2</sup>; el área de las fibras tipo HA no se determinó por el escaso número de ellas. El área promedio total fue de 3068  $\mu$ m<sup>2</sup>.

En relación a los parámetros de capilaridad se obtuvo lo siguiente: Densidad capilar 573 capilares/mm<sup>2</sup>; capilares adyacentes a las fibras tipo I: 5,16; IIB: 3,88; índice capilar por fibra: 1,76; relación área: capilar, tipo I 633  $\mu$ m<sup>2</sup>; tipo IIB: 537  $\mu$ m<sup>2</sup>.

En la tinción a-amilasa-PAS llamó la atención el aspecto de una cantidad apreciable de capilares, aproximadamente el 10%, a los cuales no se les veía la luz y mostraban engrasamiento de las paredes (fig. 1C).

Los resultados de la inmunofluorescencia directa para IgG e IgM fueron negativos, es decir, en ninguno de los cortes se pudo apreciar un patrón de depósito de estas inmunoglobulinas.

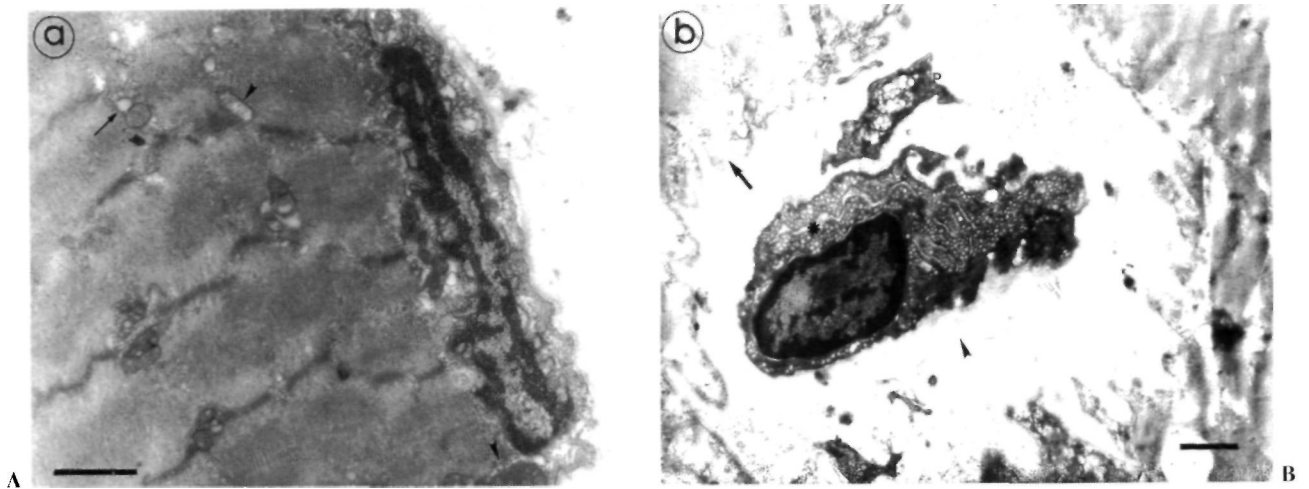
La actividad enzimática en  $\mu$ moles/min.g de músculo en peso húmedo fue para cada enzima la siguiente: HAD: 12,10; CS: 13,95 y HK: 1,17.

La microscopía electrónica reveló alteraciones mitocondriales en las fibras musculares, consisten-

tes en hinchamiento y diferente densidad electrónica (fig. 2A). El sarcoma mostró plegamiento, lo cual fue concomitante con la atrofia. En algunas fibras se vio supercontracción con desorganización de las miofibrillas y borramiento de la línea M. El retículo sarcoplasmático se encontró dilatado. Algunos de los capilares (fig. 2B) mostraron la luz ocluida con vesículas pinocíticas de distribución no uniforme, estando concentradas en algunas regiones. La densidad citoplasmática fue desigual. También en los pericitos hubo alteraciones en las vesículas, con concentración de ellas en ciertas áreas. La membrana basal apareció muy engrosada en algunos capilares. Otros capilares estaban en franco proceso de degeneración, encontrándose sólo restos de ellos.

## DISCUSIÓN

La mayoría de los trabajos publicados revisados (Index Medicus de 1970 a 1994) han realizado descripciones clínicas e histológicas de las lesiones que presentan los pacientes con miositis osificante progresiva. Muy pocos refieren aspectos histoquímicos, bioquímicos o ultraestructurales, especialmente de músculos sin afección macroscópica (3, 16). Trabajos recientes han tratado de explicar el papel del sistema inmunológico en la patogénesis de esta enfermedad (17, 18). Autores como Smith D. y col. (3), Smith B. (4) y Smith B. y col. (5), proponen que existe alteración inicial en el múscu-



**Figura 2.** A) Microfotografía del músculo gastronecmio lateral. Asterisco: nótese la desorganización de las miofibrillas con desaparición de la zona H y la línea M. Las puntas de flecha señalan mitocondrias con crestas alteradas. Barra: 1  $\mu$ m. B) Microfotografía de un capilar del músculo gastronecmio lateral. La punta de flecha indica la membrana basal engrosada. El asterisco señala la luz casi totalmente ocluida. Nótese la distribución irregular de las vesículas pinocíticas tanto en la célula endotelial como en el pericito (P). La flecha indica el plegamiento del sarcolema de una fibra muscular. Barra: 1  $\mu$ m.

lo y no en el tejido conectivo, como se sugiere en la mayoría de los otros trabajos (19-21).

En nuestro caso, a pesar de que macroscópicamente el músculo no parecía alterado, se encontró una muy baja proporción de las fibras tipo II, con atrofia de las pocas existentes. Esto es diferente a lo citado por Satoyoshi y Nonaka (2), quienes muestran en áreas no afectadas del recto femoral de miembro inferior inmóvil, atrofia de las fibras tipo I y II, pero con predominio en la proporción de fibras del tipo II. Ellos atribuyen la atrofia a la inmovilidad, sin embargo ésta usualmente afecta selectivamente a las fibras tipo II. No sabemos a qué atribuir la diferencia entre sus resultados y los nuestros. Al igual que Smith y col. (3) notamos un incremento del espacio intersticial que rodea a las fibras.

En el gastronecmio de individuos sanos las fibras tipo I constituyen del 40 al 70% (22). Sin embargo, en esta paciente las fibras tipo I representaron el 83%. Probablemente el aumento esté asociado a la desaparición de fibras tipo II. Por otra parte, en la miositis experimental (17) se encuentran sólo fibras tipo I, con desaparición de las del tipo II.

Los niveles de enzimas encontrados son algo altos dentro de lo normal y se corresponden con la abundancia de fibras oxidativas. La CS es una enzima del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la HAD interviene en la oxidación de los ácidos grasos, y la HK, aunque se le considere una enzima glicolítica, se ha visto que sus variaciones son paralelas a las de las enzimas oxidativas (23). Igualmente la

cantidad de capilares es ligeramente alta, lo cual también se corresponde con el predominio de fibras tipo I.

En los trabajos publicados revisados ninguno reporta el uso de pruebas inmunocitoquímicas o de naranja de acridina. Quisimos precisar si el proceso inflamatorio encontrado en el tejido conectivo (infiltrado inflamatorio descrito en nuestro caso y en muchos otros de la literatura) pudiera tener origen en una alteración inmunológica. No obstante, las pruebas de inmunofluorescencia para IgG e IgM humanas fueron negativas, por lo cual concluimos que no había depósito de inmunocomplejos que pudieran estar involucrados en las alteraciones observadas.

Maxwell (24) describió una elevada producción de prostaglandinas en células de cultivo (fibroblastos) de pacientes con fibrodisplasia osificante progresiva; es probable que alteraciones metabólicas jueguen un papel importante en la patogenia de la enfermedad. Los modelos experimentales de miositis osificante circunscrita, enfermedad que quizá comparta mecanismos fisiopatológicos con la miositis osificante progresiva, han tratado de explicar los eventos iniciales involucrados. Aro y col. (18) proponen que lesiones pequeñas pueden llevar a la necrosis muscular con invasión subsecuente de macrófagos, los cuales liberarían factores de crecimiento osteogénico. El mismo grupo anterior (17) demostró previamente que la formación ósea se iniciaba en el periostio cerca del músculo al cual se le inducía necrosis. En la miositis osificante progresiva es posible que el músculo sea más sensible al trauma

matismo, siendo el proceso de infiltración inflamatoria y osificación, secundario a la necrosis inicial.

Los hallazgos descritos en nuestro caso por microscopía electrónica en la fibra muscular, como son la alteración de las mitocondrias y la desorganización de las miofibrillas, se parecen a los descritos por Caulet y col. en la miositis circunscrita (25). La dilatación del retículo sarcoplasmático ha sido encontrada en la miositis osificante circunscrita experimental (17).

En ninguno de los trabajos revisados se reportan las alteraciones de los capilares. Los daños encontrados son similares a los de algunas enfermedades metabólicas como la diabetes (26) y algunas miopatías autoinmunes (27), aunque no se haya encontrado en el presente caso positividad para los anticuerpos contra el músculo.

Aunque hay evidencias de que las fibras musculares presentan alteraciones, no es posible con los datos aportados por este caso y otros de la literatura, confirmar la teoría de Smith D. y col. (3) y Smith R. y col. (5), quienes postulan que la lesión inicial está en el músculo, pues también el tejido conectivo que rodea al músculo no es normal, lo cual es indicado por el aumento del espacio intersticial. Habría que determinar qué tipos de sustancias se encuentran en dicho espacio, ya que hay evidencias en algunos trabajos de que el colágeno es diferente al normal (16), aunque otros autores no estén de acuerdo con ello (2). Igualmente, se deberían tomar biopsias de otros músculos para confirmar si las alteraciones observadas en el gastrotectomizado macroscópicamente no afectado, constituyen un fenómeno general.

### Bibliografía

1. Connor JM, Evans DAP. Genetic aspects of fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Med Genet* 1982; 19: 35-9.
2. Satoyoshi E, Nonaka I. Myositis ossificans, myoesclerosis and muscle contracture. En: Mastaglia FL, Walton J: *Skeletal Muscle Pathology*. Edinburg, London, Melbourne, New York; Churchill Livingstone, 1982; 621-30.
3. Smith DM, Zeman W, Johnston CC Jr., Deiss WP Jr. Myositis Ossificans Progressiva. Case report with metabolic and histochemical studies. *Metabolism* 1966; 15: 521-8.
4. Smith R. Myositis ossificans: a review of current problems. *Arthritis Rheum* 1975; 4: 369-80.
5. Smith R, Russell RCC, Woods CG. Myositis ossificans progressiva. Clinical features of eight patients and their response to treatment. *J Bone Joint Surg* 1976; 56B: 48-57.
6. Oropeza P. Miositis osificante progresiva. Exposición de un caso. *Arch Ven Puer Ped* 1952; 15: 43-51.
7. Velásquez M de, Borges J, Villazán F. Miositis osificante progresiva. A propósito de un caso. *Gac Med Car* 1982; 90: 181-9.
8. Guevara CJ. Miositis osificante en el niño. *Rev Fund José María Vargas* 1984; 8: 241-50.
9. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types. How many and what kind? *Arch Neurol* 1970; 23: 369-79.
10. Andersen P. Capillary density in skeletal muscle of man. *Acta Physiol Scand* 1975; 95: 203-5.
11. Novikoff A, Shin W, Drucker J. Mitochondrial localization of oxidation enzymes: Staining results with two tetrazolium salts. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 47-61.
12. Watterberg L, Leong J. Effects of coenzyme Q10 and menadione on succinate dehydrogenase activity as measured by tetrazolium salt reduction. *J Histochem Cytochem* 1960; 8: 296-303.
13. Tifford M. Basic immunofluorescence in the histology laboratory. *Laboratory Medicine* 1979; 10: 775-81.
14. Perl DP, Little BW. Acridine orange-nucleic and fluorescence. Its use in routine diagnostic muscle biopsies. *Arch Neurol* 1980; 37: 641-4.
15. Lowry O, Passonneau J. A flexible system of enzymatic analysis. New York: Academic Press, 1972.
16. Maxwell WA, Spicer SS, Milleer RL, Halushka PV, Westphal MC, Setser ME. Histological and ultrastructural studies in fibrodysplasia ossificans progressiva (myositis ossificans progressiva). *Am J Pathol* 1977; 87: 483-498.
17. Aho HJ, Aro H, Juntunen S, Strengell L, Michelsson J-E. Bone formation in experimental myositis ossificans. Light and electron microscopic study. *APMIS* 1988; 96: 933-40.
18. Aro HT, Viljanto J, Aho H, Michelsson J-E. Macrophages in trauma-induced myositis ossificans. *APMIS* 1991; 99: 483-6.
19. Lutwak L. Myositis ossificans progressive: Mineral, metabolic and radioactive calcium studies of the effects of hormones. *Am J Med* 1964; 37: 269-93.
20. Mc Kusick VA. Fibrodysplasia ossificans progressiva. Heritable disorders of connective tissue. St. Louis: C. V. Mosby Co. 1974; 687-702.
21. Kullick W et al. Elevated procollagen II peptide in myositis ossificans progressiva (letter). *Clin Rheumatol* 1989; 8: 542-3.
22. Saltin B, Gollnick PD. Skeletal muscle adaptability: Significance for metabolism and performance. En: Peachey LD, Adrian RH, Ceiger SR. *Handbook of Physiology, skeletal muscle*. Baltimore: William & Wilkins 1983; 555-631.
23. Pette D. Regulation of phenotype expression in skeletal muscle fibers by increased contractile activity. En: *Biochemistry of Exercise VI. International Series on Sport Sciences*. Saltin B. Champaign, Illinois: Human Kinetics Publishers 1986; 3-26.
24. Maxwell WA, Halushka PV, Miller RL, Spicer SS, Westphal MC, Penny LD. Elevated prostaglandin production in cultured cells from a patient with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Prostaglandins* 1978; 15: 123-9.
25. Caulet T, Adnet JJ, Pluot M, Gourgeon J, Hoffner C. Myosite ossifiante circonscrite. Etude histochemique et ultrastructurale d'une observation. *Virchows Arch Abt A Path Anat* 1969; 348: 16-35.
26. Williamson JR, Kilo C. Capillary basement membranes in diabetes. *Diabetes* 1983; 32 (Suppl 2): 96-100.
27. Finol HJ, Márquez A, Montes de Oca I, Müller B, Rivera H. Muscle ultrastructure in some autoimmune nervous diseases. *Microscópica* 1992; 1: 55-62.