

Problemas y objetivos en el desarrollo de un centro de Diagnóstico Ultraestructural

Dr. Manuel Fco. Sigarán R.*
 Dr. Jorge Vargas M.**
 Dr. Yoshimichi Kozuka***

INTRODUCCION

Desde que fue posible obtener el Microscopio Electrónico comercialmente en el mercado, les preocupó a los investigadores su uso como instrumento diagnóstico. Sin embargo no fue sino hasta 1966 que se estableció normalmente el primer programa asistencial en muchos Hospitales de Administración de Veteranos de Estados Unidos (12).

Aunque como es bien sabido los primeros reportes diagnósticos fueron publicados a principios de la década de los años 50, volviéndose más frecuentes y concretos a medida que mejoraban las técnicas de laboratorio, enriqueciéndose la patología estructural con los nuevos hallazgos y con un mejor entendimiento de sus mecanismos patogénicos.

Ha sido así que estos hallazgos han permitido orientar el diagnóstico ultraestructural principalmente hacia la patología renal, tumoral, viral, hematológica y enfermedades de depósito (9). Además en los últimos años se ha aumentado sustancialmente el interés de los clínicos en esta tecnología considerando que ya no debe permanecer confinado a los institutos de investigación (3).

Con el establecimiento de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica por el donativo del gobierno

de Japón, este tipo de servicio a la medicina ya está prácticamente al alcance del enfermo. En consecuencia uno de los objetivos de la presente publicación es dar a conocer lo que se ha hecho al respecto, por los autores y lo que se puede hacer en el futuro próximo y mediato. Asimismo se plantea la posibilidad de la creación de un centro nacional de diagnóstico ultraestructural máxime que ya hay equipo humano y de laboratorio que está trabajando parcialmente para tal propósito.

Por consiguiente la discusión se desarrollará bajo tres aspectos íntimamente relacionados entre sí y que son: I) Patología Diagnóstica; II) Educacional; III) Investigación.

I) Patología Diagnóstica.

Para Costa Rica, país pequeño con vías de comunicación adecuadas es relativamente fácil integrar uno de los principales centros hospitalarios metropolitanos con los hospitales de provincia que cuentan con servicios de Anatomía Patológica. Siendo deseable que dicho personal de provincias posea algún entrenamiento en la tecnología de la ultraestructura. Para el caso, la apropiada fijación y el sitio de escogencia de los tejidos es de suma importancia para la Microscopía Electrónica (M-E). Debe ser hecha lo más pronto posible después de separados los tejidos de su fuente circulatoria. Los líquidos fijadores, pueden ser de acuerdo al mejor de los casos; Glutaraldehído, Paraformaldehído, o el fijador de Karnovsky. Estas sustancias están disueltas a la concentración apropiada en solución tampón de fosfato (8). Bajo circuns-

*Servicios de Anatomía Patológica y Patología Experimental, Hospital México. Cátedra de Patología General U.C.R.

**Servicio de Anatomía Patológica y Cátedra de Patología General. U.C.R.

***Profesor visitante. Unidad de Microscopía Electrónica, U.C.R.

tancias semejantes McDowell y colaboradores (8) recomiendan una mezcla de formaldehído comercial al 4% y gluteraldehído al 1% solubilizados en amortiguador de fosfato de 176 miliosmoles por litro. Los tejidos deben de permanecer en el fijador de dos a tres horas óptimamente, hasta dos, tres días o más, tiempo que sería el empleado en hacer llegar las muestras hasta el centro diagnóstico de M-E. Durante este intervalo deberán observarse las siguientes precauciones: Los tejidos deberán ser colocados en refrigeración, no congelación, a temperatura de 4 °C, o ligeramente más alta durante su despacho al centro de diagnóstico para su procesamiento ulterior. También es altamente deseable que las muestras se acompañen de información clínica adecuada y de cortes de Parafina, los cuales complementarán la ultraestructura. Como es natural éste último envío, cortes de parafina, sería recibido días más tarde, intervalo ocupado en el procesamiento y la obtención de los cortes "gruesos" de una micra que sirven de orientación para el M-E.

En casos rutinarios bien puede tardar unos diez días el procesamiento de las muestras, su observación en el M-E, el estudio de las fotografías, y la elaboración de un reporte escrito junto con dos fotos seleccionadas para mandar a la fuente de envío. Aunque debe quedar claro que ello es posible con personal cuya tarea primordial sea la ultraestructura. En centros organizados y con experiencia un reporte de M-E, por ejemplo de riñón toma tres o más días, tiempo que es comparable al empleado para coloraciones histológicas especiales (6).

Situación común del microscopista electrónico es aquella en la cual la muestra conflictiva ya ha sido fijada en su totalidad en formalina al 10% diluida en agua corriente (Fig. 1). Este problema de fijación deficiente podría ser fácilmente obviado en parte, usando los servicios de Anatomía Patológica formalina neutra "buferezada". Empleando esta formalina, que dista mucho de ser ideal para el M-E se logra preservar un poco mejor algunos organelos citoplasmáticos y nucleares. Puede también ocurrir en muchos casos como por ejemplo biopsias de aguja que todo el tejido esté ya incluido en parafina. Sin embargo en estos casos también es posible recoger información diagnóstica adicional. Ya que algunas estructuras celulares que ayudan al diagnóstico resisten ese tratamiento, tal como: cuerpos neurosecretorios, inclusiones virales, miofilamentos, glucógeno, tonofibrillas. (5,7).

El material proveniente de autopsias presenta problema especial. En efecto, por haber transcurrido usualmente tiempo considerable (de horas) entre la muerte y la toma del tejido, estas muestras son terreno propicio para múltiples artificios. Por ello, tratando de preservar en lo posible los fenómenos autolíticos se deben fijar los tejidos tan rápido como sea posible (10). Ferguson (4) al parecer con éxito, ha colocado algunas muestras en condiciones apropiadas, resultando que la apariencia ultraestructural publicada en su trabajo mejora significativamente al desaparecer algunos fenómenos autolíticos.

Respecto al costo en el procesamiento de cada biopsia se puede estimar groseramente que durante el año 1978 en la sección de Patología Experimental ha sido de ₡1.100.00 por cada espécimen. Es así que han sido procesadas un promedio de 70 muestras anualmente durante los dos años de existencia de esta sección. Este número representa un promedio de 1:214 biopsias del Hospital México o porcentualmente 0.4%. Este porcentaje es bastante bajo por lo que es deseable se haga mayor. Al respecto es bien sabido que hay problema diagnóstico en cinco al ocho por ciento en biopsias recibidas en servicios de Anatomía Patológica. De tal porcentaje por lo menos en la mitad o en la tercera parte el M-E puede dar ayuda inapreciable. Por otra parte en una unidad organizada de diagnóstico ultraestructural se procesan anualmente 250 a 300 muestras. Por consiguiente los presentes autores son de la opinión de poder estar en capacidad de aumentar la admisión de material hospitalario una vez se replanteen los objetivos de la sección. Por experiencia de otros (12) en una encuesta de 264.000 biopsias, la microscopía electrónica fue hecha en 6.000, aproximadamente el dos por ciento. De estos 6.000 especímenes, 29% fueron del riñón y 36% de diversos tumores. Consideran finalmente esos autores que el cuatro al cinco por ciento de las biopsias ameritan estudio al M-E.

II) Educativo.

El aspecto educativo es de gran importancia en un programa exitoso de Microscopía Electrónica. Por su naturaleza misma es deseable que este ángulo deba ser realizado en estrecha cooperación con la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica. Aunque es obvio que el personal de las secciones de diagnóstico ultraestructural debe delinear claramente los objetivos en la formación de ese personal.

La educación en ultraestructura a nivel de pre-grado, específicamente a estudiantes de medicina bien podría iniciarse incluyendo en el curriculum de Anatomía aspectos relevantes de M-E. Ello podría ser posible sin aumentar el curriculum de la asignatura poniendo énfasis en la comparación con Microscopía Óptica. De manera similar podría hacerse en Patología General y aun en algunas asignaturas clínicas.

A otro nivel, o sea con médicos residentes en Anatomía Patológica se les podría invitar a que tomaran voluntariamente u optativamente el curso de ultraestructura ya programado en la Unidad de Microscopía Electrónica. De esa manera obtendrían experiencia inestimable y sobre todo les brindaría la oportunidad de conocer la mística de esa tecnología. Aprenderían entre otras cosas a conocer los aspectos básicos de diversas técnicas, sus indicaciones así como sus limitaciones. Azar y col. (1) proponen con buen criterio un cuarto año de residencia en Patología dedicado a Microscopía Electrónica a aquellos estudiantes graduados médicos residentes que deseen tomar este campo como una subespecialidad.

El otro nivel de personal a preparar sería el auxiliar pudiendo comprender aquí desde el Biólogo y Microbiólogo, ya graduado, hasta el laboratorista. Al respecto, este último tipo de personal debería tener como requisito mínimo para ingresar al campo de M-E, por lo menos un año de asignaturas biológicas de la Universidad. Su entrenamiento básico sería el de conocer a nivel elemental la tecnología en la preparación de las muestras, familiarizarse con el funcionamiento diario del M-E, manejar las técnicas de ultramicrotomía, de coloraciones y de las fotografías.

Actualmente programas como el esbozado anteriormente ya están en marcha en diversos centros universitarios médicos de Estados Unidos (2). Específicamente en los Hospitales de la Administración de Veteranos con éxito completo.

Finalmente, en una sección de M-E, con programas educacionales en desarrollo sería deseable que ingresaran por cortos períodos, optativamente, médicos residentes en áreas clínicas.

III) Investigación.

Premisa para que una sección de diagnóstico ultraestructural tenga éxito debe ser que esté dirigida por personas entusiastas, con interés activo en investigación experimental (1). En caso contrario, inversión tan costosa

correría peligro de caer en desuso con su consiguiente deterioro. Pues es bien sabido que a través de la investigación es como se conserva la curiosidad por la renovación constante y adquisición de conocimientos. Para Costa Rica, país de recursos limitados, este tipo de actividad bien puede tomar su sitio prominente.

En los últimos quince años se ha avanzado considerablemente, cuando para entonces se lamentaba la ausencia de actividad investigativa en la Facultad de Medicina (13). Sin embargo, dicha realidad ha variado favorablemente, debido en gran parte a la estabilidad social, política y económica reinantes localmente y de la que prácticamente no goza ningún país latinoamericano.

El recurso humano de investigación creadora actualmente es bastante escaso, pero con las condiciones reinantes en el país bien puede ser posible crear a mediano plazo todo un equipo bio-médico con interés en este campo. Bien se podría iniciar tal programa como hacen en otros países en una primera etapa becando por parte de las Instituciones de Salud en conjunción con la Universidad durante las vacaciones a jóvenes estudiantes de medicina para que colaboren con programas de investigación que ya existen y más importante, que estén activamente publicando. Se podría iniciar con algunas técnicas básicas que estén siendo aplicadas en los centros de su trabajo. A través de ellas revisarían la bibliografía para penetrar al final de cada período de vacaciones a un seminario sobre las actividades desarrolladas. De todos estos candidatos algunos de ellos, a los más calificados una vez graduados podría ofrecerles sea en la Facultad de Medicina o en los Hospitales del Seguro Social una posición permanente en "Patología General" no sólo en Anatomía Patológica y con énfasis en ultraestructura. Estos candidatos de acuerdo a los conceptos de Azar (1), durante su residencia deberían tomar en un cuarto año, rotación obligatoria por Patología Experimental o por Unidad de Microscopía Electrónica en cuya instalación en la Universidad de Costa Rica se puede hacer investigación en las áreas de microscopía de transmisión y de microscopía de rastreo con aplicación biomédica, usando además las técnicas de fractura y de "crio-grabado". En dicho centro además podrían desarrollar la microscopía electrónica orientada hacia la citoquímica, histoquímica, radioautografía y microanálisis de rayos X. A continuación en forma optativa deberían permanecer un corto período dentro de ese cuarto año de acuerdo a su interés, en

laboratorios de cultivo de tejidos, Inmunofluorescencia, Parasitología, Citogenética, Bacteriología, Virología. Personal así formado sería muy calificado y listo para convertirse en verdadero líder en el campo de la Patología. Con esta formación además de prestar servicio asistencial de gran calidad en la institución en que trabajara, estaría además en capacidad de desarrollar programas de investigación sencillos o sofisticados de acuerdo a su interés y habilidad.

Ya existen actualmente centros cuya función primordial es la actividad investigativa y que dependen parcialmente de la Universidad de Costa Rica, del CONICIT, o de fuentes gubernamentales. Por consiguiente, en estos centros es donde podrían iniciarse, los primeros candidatos a este tipo de programa.

Aspecto importante que debe ser solucionado es el que se refiere a las fuentes bibliográficas. Actualmente el acceso a revistas especializadas es bastante complejo y sumamente restringido, con múltiples limitaciones. Por consiguiente es necesario buscar la manera de agilizar dicho acceso en las diferentes bibliotecas de la Universidad como las de los Hospitales. Asimismo es indispensable enriquecer dichas fuentes bibliográficas con la adquisición de revistas científicas que no existen en el país, así como de importantes monografías.

Inversión de la medicina en este rubro podrá llegar a producir grandes satisfacciones para el país, máxime que personal de este tipo ya existe en áreas paramédicas fuera de la Facultad de Medicina.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se propone la creación de un centro de diagnóstico ultraestructural que daría asistencia a los Servicios de Patología del país. Para tal propósito se recomienda:

1. Replanteamiento y nueva definición de los objetivos de la Sección de Patología Experimental del Centro de Docencia e Investigación. En esta Sección ya se cuenta con el equipo básico de laboratorio, así como con personal entrenado en el exterior. Hasta el momento este servicio se ha proporcionado de manera ocasional e irregular a especímenes provenientes principalmente del Hospital México.
2. Establecer intercambio solicitando asistencia y asesoramiento con la Universidad de Costa Rica. Contacto semejante de asistencia y asesoría deberá efectuarse con CONICIT, Institutos de Investigación dependientes o no de las Universidades y con Facultad de Medicina.
3. Establecer personal a todo nivel, con dedicación exclusiva a esta actividad, el cual recibiría material de todos los hospitales del país. El

personal con mayor diferenciación o sea el profesional deberá dar educación continuada a personal joven. Asimismo es indispensable que parte importante de sus actividades estén concentradas en investigación experimental original. En este aspecto es imprescindible agilizar y enriquecer las fuentes bibliográficas nacionales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— AZAR, A.; W.A. MORNIGSTAR; R. VRACKO, and J. WHITE, 1975: Problems in the Development of a Clinically Oriented Program in Electron Microscopy. *Human Pathol.*, 6:485-9.
- 2.— BLOODWORTH Jr.; J.M.B.; W.A. BURNS; A.S. DAOUD; R. VRACKO, and E.D. WALDO, 1975. Education and Training in Electron Microscopy. *Human Pathol.*, 6: 491-7.
- 3.— BURNS, W.A.; H.J. ZIMMERMAN; J. HAMMOND; A. HOMATSON; A. KATZ, and J. WHITE, 1975. The Clinician's View of Diagnostic Electron Microscopy. *Human Pathol.*, 6:467-78.
- 4.— FERGUSON, C.C., and T. LEHY, 1978. A simple Technique for the Utilization of Postmortem Tracheal and Bronchial Tissues Ultrastructural Studies. *Human Pathol.*, 9: 463-70.
- 5.— GONZALEZ-ANGULO, A.; I. TUIZ DE CHAVEZ, and M. CASTAÑEDA, 1978: A Reliable Method for Electron Microscopic Examination of Specific Areas from Paraffin-embedded Tissues Mounted on Glass Slides. *Amer.J.Clin.Pathol.*, 70:677-9.
- 6.— JOHANSEN, J.V., 1973: Rapid Processing of Kidney Biopsies for Electron Microscopy. *Kidney International*, 3:46-50.
- 7.— JOHANSEN, J.V., 1977: Use of Paraffin Material for Electron Microscopy. *Pathol. Annu.*, 12(2): 189-224.
- 8.— McDOWELL, E.M., and B.F. TRUMP, 1976: Histologic fixatives Suitable for Diagnostic Light and Electron Microscopy. *Arch.Pathol. Lab.Med.*, 100:405-14.
- 9.— ROSAI, J., and H.A. RODRIGUEZ, 1968: Application of Electron Microscopy to the Differential Diagnostic of Tumors. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 50:555-62.
- 10.— TRUMP, B.F.; J.M. VALIGORSKY; T.R. JONES, W.J. MERGNER, J.H. GARCIA, and R.A. COWLEY, 1975: The Application of Electron Microscopy and Cellular Biochemistry to the Autopsy. *Human Pathol.*, 6: 499-518.
- 11.— WEITOUN, P., and T. LEHY, 1970. Utilization of Paraffin-embedded Material for Electron Microscopy. Study of and A₂-Cell Type Microadenoma of the Endocrine Pancreas *Lab.Invest.*, 23-52-7.

12.— WILLIAMS, M.J., 1975: Electron Microscopy in the Veterans Administration for Service Pathology: Some Administrative Aspects of the Program. Human Pathol., 6:399-400.

13.— YGLESIAS V.A., 1965: Investigación en Anatomía. Arch.Col.Méd., El Salvador, 20: (Supl.):88-96.



Fig. 1a.—Adenocarcinoma de Corteza Suprarrenal. Muestra tomada de la pieza operatoria, la cual fue fijada en formalina comercial al 10% y luego post-fijada en Osmio. Puede observarse destrucción casi total de los organitos citoplásmicos, así como de esta membrana. Sin embargo es posible reconocer que la membrana nuclear presenta invaginaciones profundas, lo que es frecuente en células anaplásicas. Hacia la parte baja y central de la fotografía, se pueden identificar aún restos de retículo endoplasma granular.

Tejidos cortados en Ultramicrotomo Reichert OMU-3. Coloreados con Citrato de Plomo y Acetato de Uranil. Foto tomada en Microscopio Electrónico Hitachi, modelo HU-12A de la Universidad de Costa Rica. Aumento de la fotografía 16.800x.

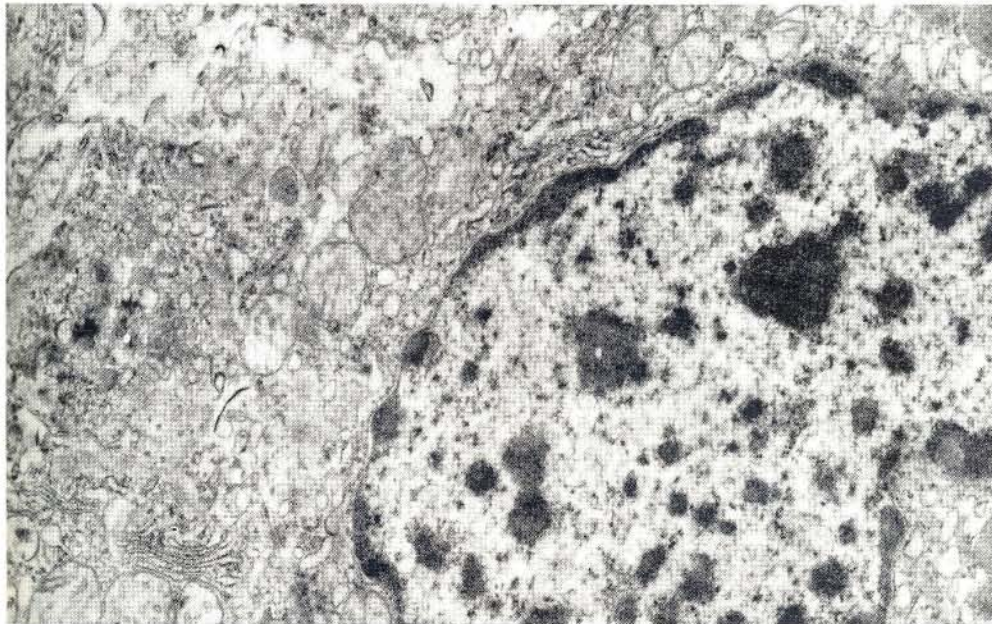


Fig. 1b.—Mismo tumor tomado 18 meses más tarde. Los tejidos fueron incluidos en Fijador de Kanovsky, dos horas después de producirse la muerte. Puede notarse la gran riqueza de detalles estructurales citoplásmicos y nucleares, siendo fácilmente identificables mitocondrias, retículo endoplasma y otros. Aumento de la fotografía 16.800.