

# Proyecciones del diagnóstico ultraestructural de apoyo en el Hospital México

Manuel F. Sigarán\*

Fernando Brenes P.\*\*

Jorge Vargas Marín\*\*\*

## RESUMEN

Durante los últimos cinco años se ha estado empleando la ultraestructura morfológica simple para el estudio de lesiones tumorales y degenerativas de pacientes en el Hospital México. Para ello se utilizan los microscopios electrónicos de la Universidad de Costa Rica, siendo preparados enteramente los especímenes en Patología Experimental del Centro de Docencia e Investigación de la Caja Costarricense de Seguro Social.

A través de esa experiencia se ha encontrado mayor utilidad de la Ultraestructura para tumores de tejidos blandos, tumores endocrinos, patología hepática viral y de depósito y patología renal. Se considera necesario vigorizar el programa naciente de inmunoperoxidasas, ya que es un arma diagnóstica de valor incalculable; además de ser técnica de bajo costo con material elaborado localmente y que es utilizable tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica, lo que redundaría en gran beneficio para el paciente. Otra tecnología a desarrollar es la de Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) mediante la cual, algunos especímenes hasta ahora tributarios casi exclusivamente de Microscopía Electrónica, dan resultados satisfactorios, con el ahorro consiguiente.

---

+ Resultados preliminares parcialmente presentados en Primeras Jornadas de Investigación, Universidad de Costa Rica, Dic. 1981.

\* Patología Experimental y Servicio de Anatomía Patológica, Hospital México, Cátedra de Patología General, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica.

\*\* Servicio Anatomía Patológica, Hospital México, Cátedra de Patología General, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica.

\*\*\* Servicio Anatomía Patológica, Hospital México, Cátedra de Patología General, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica.

## INTRODUCCION

Con el advenimiento y comercialización de las resinas epóxicas, la resolución de los cortes ultrafinos para Microscopía Electrónica (M-E) aumentó significativamente. Entre otros artificios, fue eliminada la distorsión de los tejidos de hasta un 25%, acarreada por el material de inclusión más popular en aquel tiempo: el metacrilato. Fue así que el uso de esta tecnología en laboratorios histopatológicos se incrementó y popularizó, aún en países pobres con recursos limitados.

En el año 1977, en el Hospital México fue iniciado este programa de diagnóstico ultraestructural (17), proporcionando entonces servicio en escala limitada a ese Centro, así como a otros hospitales del área metropolitana, hospitales que ya cuentan ahora con su propio laboratorio de ultramicrotomía.

En el presente trabajo se expondrá la importancia de esta tecnología, así como sus indicaciones, sus limitaciones y las perspectivas para aumentar su certeza diagnóstica con la ayuda de inmunocitoquímica.

## I) IMPORTANCIA DE LA TECNOLOGIA

En los principales centros médicos universitarios del mundo, la Microscopía Electrónica (M-E) diagnóstica es ya una técnica de rutina utilizada en múltiples tipos de lesiones. Así, en Patología Renal es de uso rutinario, combinándola con inmunofluorescencia. Tiene también clara indicación en el diagnóstico diferencial de tumores de

tejidos blandos, neoplasmas endocrinos, en enfermedades de depósito de patología hepática, tal como la enfermedad de Wilson y las hepatopatías causadas por virus. Esto último dentro de un proyecto conjunto entre la Universidad de Costa Rica y el Hospital México de la C.C.S.S.

En enfermedad de Wilson ha sido de gran utilidad, especialmente en casos sospechosos en los cuales la tinción para demostrar cobre no es concluyente. Sternlieb y Scheinberg (19) han descrito cambios patognomónicos en organelos citoplásmicos del hepatocito. Cambios tales como peroxisomas gigantes, cuerpos densos que contienen cobre y alteraciones de la densidad de la matriz mitocondrial y en la forma de éstas. Estos cambios han permitido diagnósticos en algunos casos en etapas tempranas e iniciar el tratamiento respectivo con el consiguiente beneficio para el paciente.

En relación con hepatopatías por virus B, se han estudiado principalmente los casos crónicos. Se han observado partículas virales, tal como el antígeno "core" dentro del núcleo en casos de hepatitis crónica activa (Fig.1). También se ha observado el antígeno de superficie en el citoplasma en forma de túbulos.

En tumores endocrinos se ha estado empleando este instrumento satisfactoriamente, tomando como parámetros diagnósticos los organelos citoplásmicos necesarios para manufactura, empaque, almacenamiento y secreción de hormonas (1,5). De tal modo, uno de los objetivos logrados hasta el momento ha sido la mayor precisión en el diagnóstico de tumores hipofisarios, estableciéndose una clasificación funcional (15). En este Centro se ha seguido esa clasificación, encontrando acuerdo casi completo morfológico funcional (18), basándose al momento casi exclusivamente en el tamaño de los gránulos secretores (14). A manera de ejemplo se puede citar, siempre en hipófisis, la clasificación clásica de la variedad "cromóforos" funcionales, pues poseen gránulos secretores no demostrables aún con histoquímica por poca sensibilidad a nivel de Microscopía Óptica (MO), siendo visibles únicamente con M-E.

La indicación precisa de la Ultraestructura en el estudio de carcinoide es clara, ya que la M-O no es siempre satisfactoria, basándose

muchas veces en parámetros subjetivos. En consecuencia, a nivel ultraestructural es indispensable encontrar gránulos citoplásmicos de morfología y densidad variable (por ejemplo, en diana) o en forma de palillo de tambor (1).

Otra indicación clara de esta tecnología radica en la determinación de la histogénesis de tumores. Se ha estimado que la M-E es aplicable a un ocho por ciento de tumores que son recibidos en Patología de un hospital, en los cuales la M-O con las tinciones especiales sea de resultados ambiguos (6). Bajo bases puramente morfológicas, el M-E proporciona valiosa ayuda para diferenciar un carcinoma anaplásico de un sarcoma anaplásico, al encontrar en el primer caso estructuras semejantes a desmosomas, microtúbulos, microfilamentos u otros organelos citoplásmicos de célula epitelial. También se le utiliza para diferenciar carcinomas escamosos poco diferenciados de adenocarcinomas al encontrar en el último microvellosidades apicales y lumen tubular (3).

Situación común que se presenta en los laboratorios de Anatomía Patológica consiste en aquella por la cual, después del examen rutinario de determinada pieza quirúrgica, hay aspectos que no pueden resolverse solo con microscopía óptica convencional. En consecuencia se hace necesario procesar para M-E tejidos ya fijados usualmente en formalina ácida, obteniendo resultados poco halagüeños, ya que gran número de marcas citoplásmicas se pierden. Por consiguiente, es muy deseable por lo menos fijar rutinariamente los tejidos en formalina neutra amortiguada en fosfatos o en formol neutro. Es preferible tomar de la pieza fresca una pequeña muestra representativa para fijar adecuadamente en glutaraldehído al 2.5 por ciento, amortiguando en fosfatos y a 4°C de temperatura. En caso de no contar con ese fijador en calidad de microscopía electrónica, se puede preparar el fijador recomendado por McDowell y Trump (11) a base de glutaraldehído y formalina comercial, debiendo tener presente que el tejido debe ser hasta de 2 mm de espesor y que se debe mantener a 4°C en el refrigerador.

En algunas ocasiones puede ocurrir que el interés para examen ultraestructural se concentre en un solo micronódulo que está en un bloque de parafina o en el corte



histológico ya montado y teñido en el portaobjetos de vidrio. Sin embargo, en ambos casos es posible rescatar la estructura a estudiar (4), tal como puede ser apreciado en la figura 2, en el cual se reconocen claramente los gránulos secretores.

## II) VARIANTES CON TEJIDOS INCLUIDOS EN RESINAS EPOXICAS

### a) Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR).

El objetivo primario de esta técnica es para obtener cortes "gruesos" de 0.5 a 1 micra ( $\mu$ ) de espesor, con superficie tan grande como 1.3x1.0x0.2 cm y que luego puedan ser usadas para cortes finos a estudiar ultraestructuralmente (8). El aumento de la resolución de los tejidos, conducirá a bajar los costos en el procesamiento de las muestras y a acortar el tiempo de examen de los mismos. Valga el ejemplo de poder observar en MOAR la fusión de los podocitos en nefropatía lúpica (8). Sin embargo, debe aclararse que el MOAR aún no puede competir con la histología convencional en parafina, por ser mayor su costo y por la dificultad para emplear todas las tinciones usadas rutinariamente en tejidos incluidos en parafina (2,10). En este Centro se está iniciando su empleo con resultados alentadores, empleando Epon 812 (Fig. 3).

### b) Inmunocitoquímica.

Con el empleo del cultivo de tejidos y de células, el uso de animales de laboratorio como los ratones desnudos atímicos y con la inmunoperoxidasa se ha incrementado de manera importante el área de trabajo de la patología diagnóstica y de la patología experimental. En condiciones satisfactorias de trabajo, esta tecnología es también tributaria de microscopía electrónica con énfasis hacia las inmunoperoxidasas, la cual se considera tan sensible como el radio-inmunoensayo. La peroxidasa del *nabo* ("horse radish peroxidase") tiene como ventajas ser electrodensa y de muy alta resolución y al marcar con ella anticuerpos contra antígenos específicos es posible localizar en la célula los productos densos, resultado de la unión del antígeno tisular con el anticuerpo marcado.

El espectro diagnóstico de la inmunocitoquímica es sumamente amplio, siendo usado

casi rutinariamente en centros médicos universitarios para el diagnóstico diferencial de cáncer (7). La técnica está limitada únicamente por la obtención de los antisueros específicos para determinada proteína antigénica. De tal modo se ha podido demostrar el antígeno de superficie de la hepatitis viral B en el citoplasma del hepatocito con técnica ya descrita (9). Es así que se demostró su presencia dentro del sistema del retículo endoplasma granular (Fig. 4). Además, habiéndose demostrado que la saliva de portadores del virus de la hepatitis B es infectante (12), se aplicó la técnica a glándulas salivales de un portador, demostrando su presencia en cisternas del retículo endoplasma rugoso de células mucosas y serosas.

Como ya fue dicho antes, se está tratando de establecer una clasificación morfofuncional en tumores endocrinos, específicamente en hipófisis. Sin embargo, tal objetivo sólo puede ser alcanzado plenamente hasta lograr obtener los antisueros específicos para marcar los gránulos con las diferentes hormonas (13). Puede ocurrir que en estos tumores haya granos de diferentes tamaños en la misma célula (Fig. 5) lo que bien podría corresponder a tumores secretores de otras tantas hormonas aún no diagnosticados en Costa Rica. En tales casos, la única manera microscópicamente sería marcándolos con su antígeno específico, el cual puede ser producido en mamíferos de laboratorio.

A manera de información se ha encontrado que el complejo de proteína estructural, la queratina, es un excelente marcador para el diagnóstico diferencial en muchos tipos de tumores, como el carcinoma escamoso, mesotelioma, carcinoma transicional, sirviendo su presencia para determinar la histogenesis (16). Siguiendo esas indicaciones, se está iniciando la obtención del antígeno purificado, el cual será inyectado a conejos receptores para la producción de anticuerpos y realizar la técnica de Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP).

## BIBLIOGRAFIA

1. Battifora, H., Ultrastructure of Endocrine Neoplasms. Ann. Clin. & Lab. Sci., 9: 164-72. 1979.
2. Burns, W.A., M. Bretschneider, & A.B.

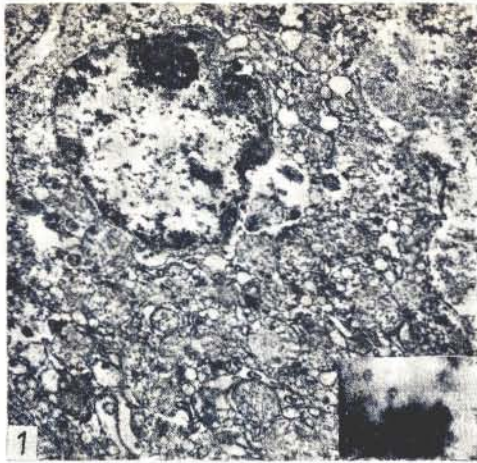
- Morrison. Embedding in Large Plastic Blocks. Diagnostic Light and Potential Electron Microscopy on the Same Block. *Arch. Path. & Lab. Med.*, 103: 177-79, 1979.
3. Ghadially, F.N. The Role of Electron Microscopy in the Determination of Tumour Histogenesis. *Diagn. Histopath.*, 4: 245-62, 1981.
  4. González-Andulo, A., I. Ruiz de Chávez, & M. Castañeda. A Reliable Method for Electron Microscopic Examination of Specific Areas from Paraffin-Embedded Tissue Mounted on Glass Slides. *Am. J. Clin. Path.*, 70: 687-99, 1978.
  5. Gould, V.E., J. Valaitis, Y. Trujillo, G. Chejfec, & J.G. Gruhn. Neuroendocrinoma of the Jejunum: Electron Microscopic and Biochemical Analysis. *Cancer*, 46: 713-17, 1980.
  6. Gyorkey, F., K.-W. Min, I. Krisko, & P. Gyorkey. The Usefulness of Electron Microscopy in the Diagnosis of Human Tumors. *Human Path.*, 6: 421-41, 1975.
  7. Herbermann, R.B. Immunologic Tests in Diagnosis of Cancer. *Am. J. Clin. Path.*, 68: 688-89, 1977.
  8. Hoffman, E.O., & T.R. Flores. Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR) en el estudio de las glomerulopatías. *Patología*, 18: 327-40, 1980.
  9. Huang, S.N., & A.R. Neurath. Immunohistologic Demonstration of Hepatitis B Viral Antigens in Liver with Reference to its Significance in Liver Injury. *Lab. Invest.*, 40: 1-17, 1979.
  10. Lim, B., C.T. Liew, & J.R. Craig. Plastic-Embedded Thin Sections for light Microscopy. *Lab. Med.*, 12: 145-49, 1981.
  11. McDowell, E.M., & B.F. Trump. Histologic Fixatives Suitable for Diagnostic Light and Electron Microscopy. *Arch. Path. & Lab. Med.*, 100: 405-14, 1976.
  12. Macaya, G., K. Visoná, & M. Villarejos. Dane Particles and Associated DNA-Polymerase Activity in Saliva of Chronic Hepatitis B Carriers. *J. Med. Virol.*, 4: 291-301, 1979.
  13. Pelletier, G., F. Robert, & J. Hardy. 1978. Identification of Human Anterior Pituitary Cells by Immunoelectron Microscopy. *J. Clin. Endocrin. & Metabol.*, 46: 534-42, 1978.
  14. Rosai, J., *Ackerman's Surgical Pathology*. 6th Ed., pp. 1603-12. The C.V. Mosby Co., St. Louis, Toronto, London, 1981.
  15. Scanarini, M., & S. Mingrino. Functional Classification of Pituitary Adenomas. *Acta Neurochir.*, 52: 195-202, 1980.
  16. Schlegel, R., S. Banks-Schlegel, J.A. McLeod, & G.S. Pinkus. Immunoperoxidase Localization of Keratin in Human Neoplasms. *Am. J. Path.*, 101: 41-50, 1980.
  17. Sigarón, M.F., J. Vargas, & Y. Kozuka. Problemas y Objetivos en el Desarrollo de un Centro de Diagnóstico Ultraestructural. *Acta Méd. Cost.*, 22: 83-87, 1979.
  18. Sigarón, M.F., O. Gei-Guardia, F. Alvarado & C. Cabezas. Correlación Clínico-Ultraestructural de Adenomas Hipofisarios en el Hospital México. II. Análisis Ultraestructural. XLV Congreso Médico Nacional, 1-4 Diciembre, 1981.
  19. Sternlieb, I., I.H. Scheinberg. Wilson's Disease. In: Schaffner, F., S. Sherlock, & C.M. Leavy (Eds.). *The Liver and its Diseases*, pp. 328-36. Thieme Co., Stuttgart, West Germany, 1974.

#### NOTA

Las fotografías electrónicas fueron tomadas en los microscopios electrónicos de transmisión Hitachi HU-12A y H-300 de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica. Los especímenes fueron procesados en Patología Experimental del Centro de Docencia e Investigación de la C.C.S.S.

Los tejidos fueron fijados en glutaraldehído amortiguado en Fosfatos al 2.5%; incluidos en Araldita y/o Epon 812 y teñidos con acetato de uranil y citrato de plomo.

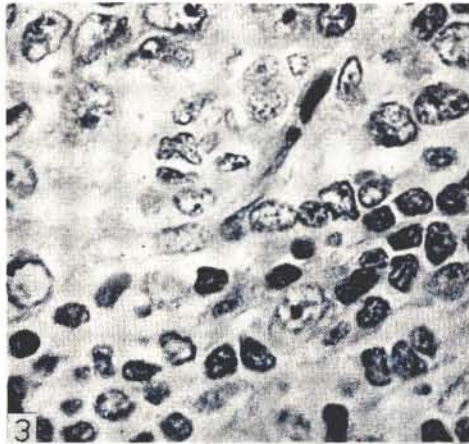




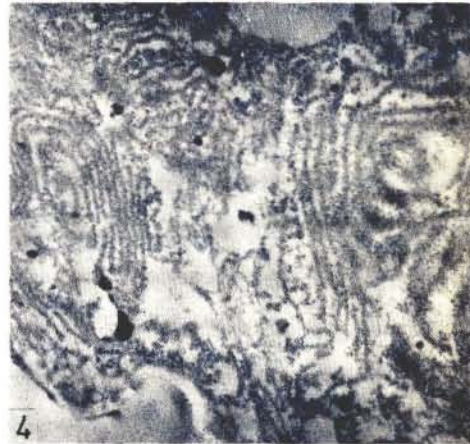
Hepatocito de un caso de hepatitis crónica persistente por virus "B", en cuyo núcleo se encuentran condensaciones (Aumento de 4000 X) En el recuadro se aprecian varias esferas huecas de 24 nm de diámetro, correspondientes a partículas "core" del virus. (Aumento de 75000 X)



Tumor carcinoide extraído, del bloque de parafina. A pequeño aumento se ven varias células tumorales redondeadas con el citoplasma presentando moderada granulación. Aumento de 4000 X. El recuadro del ángulo inferior derecho presenta varios gránulos polimórficos de este tipo de células. Aumento 30000 X.



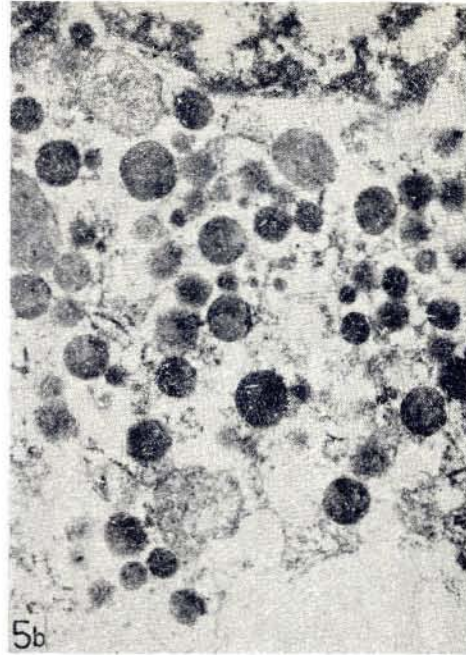
Ganglio linfático incluido en resina epóxica y cortada a una micra de espesor, pudiendo ser apreciadas claramente células linfoides en diversos grados de maduración. Tinción de hematoxilina-eosina. Aumento original 1000 X.



Porción de citoplasma de un hepatocito (en caso de hepatitis crónica activa) parasitado con antígeno de superficie marcado con "peroxidasa de nabo" enzima que le vuelve discernible con el M-E. Es notable la abundancia de retículo endoplasmático granular con la presencia de partículas virales. Tejido sin teñir, técnica de inmunoperoxidasa-indirecta. Aumento de 15000 X.



5a. -Adenoma hipofisiario cuyas células presentan moderada granularidad citoplásmica irregular. Aumento 3000 X.



5b. -Porción de citoplasma de célula tumoral cuyo núcleo está en el borde izquierdo de la fotografía. Puede notarse la variedad de los gránulos secretorios en cuanto a su diámetro y densidad. Aumento 30.000 X.

#### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al personal de Patología Experimental la colaboración y el entusiasmo con que fueron procesadas a lo

largo de todo el procedimiento el material aquí presentado. A la Sra. Vera V. Muñoz por su paciencia y amabilidad en la corrección mecanográfica de nuestros errores.