

01664

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTUDIO COMPARATIVO - HISTOQUIMICO,
INMUNOHISTOQUIMICO Y ULTRAESTRUCTURAL -DEL
HÚMERO NEUMATIZADO DE LAS AVES Y EL QUISTE OSEO
UNICAMERAL DE LOS HUMANOS**

Tesis de Posgrado

Para obtener el título de

Maestría en Ciencias Veterinarias : Patología

P R E S E N T A

M.VZ GIZELA ARCELIA MALDONADO HERNANDEZ

Director de Tesis: **Dr. Hector Abelardo Rodríguez Martínez**

Junio 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Héctor Abelardo Rodríguez Martínez, porque sin su propuesta este tema de tesis no existiría. Gracias por su ayuda incondicional para la realización de este trabajo pero sobre todo, gracias por compartir conmigo y con todos sus alumnos sus amplios conocimientos tanto científicos como culturales, con el solo deseo de convertirnos en un reflejo de lo que usted es: UN TRIUNFADOR. Gracias por su amistad y por enseñarme la patología a través de sus ojos.

A mis padres y mi hermanita, porque me han apoyado durante toda mi vida, y me han impulsado a seguir adelante en mis proyectos y planes de vida con el solo objetivo de verme feliz.

A mi hija Mariana Carolina. Angelito precioso, tu llegaste para mostrarme lo que en verdad tiene valor en la vida, creo que yo no podría enseñarte más de lo que tu me estas enseñando, eres mi linda maestra y le has dado luz a todo. Gracias hija por impulsarme a superar y a desear lo mejor en mi vida desde que naciste.

A mis amigos Rodolfo Ramos, Luis Montesinos, Verónica Olgún por su ayuda moral y por siempre estar dispuestos a ayudar y escucharme. Rafael, gracias por ser mi amigo y por enseñarme a amar la patología Veterinaria.

A la química María de la Luz Rosales Montaña, Jaime Eugenio Córdova López y Luis Antonio Morales Arreola por su ayuda para la realización de los estudios de ultraestructura, fotografía e histoquímica.

INDICE

pagina

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Objetivo	13
Hipòtesis	14
Material y Método	15
a) Diseño Experimental.....	15
b) Material de Observación.....	15
c) Método.....	15
d) Técnicas de Histoquímica.....	17
e) Técnicas de Inmunohistoquímica.....	17
f) Microscopía Electrónica de Transmisión.....	20
g) Observador.....	21
Resultados	22
a) Estudios de Histoquímica.....	22
b) Estudiosde Inmunohistoquímica.....	25
c) Estudios de Ultraestructura.....	26
c) Resultados de Quistes Óseos Unicamerales Humanos....	30
Discusión	32
Conclusiones	46
Bibliografía	48
Cuadro 1	52
Cuadro 2	53
Cuadro 3	54
Figuras	55

ESTUDIO COMPARATIVO - HISTOQUIMICO , INMUNOHISTOQUIMICO Y ULTRAESTRUCTURAL -DEL HUMERO NEUMATIZADO DE LAS AVES Y EL QUISTE OSEO UNICAMERAL DE LOS HUMANOS.

RESUMEN:

La separación entre aves y mamíferos ocurrió hace 250 a 300 millones de años, y la de otros mamíferos y el hombre hace 65 a 80 millones de años. Existen algunos genes mutantes, portadores de cambios permanentes heredables en la secuencia de su ADN genómico, que al codificar proteínas anormales pueden producir malformaciones estructurales corporales.

Los huesos de aves y mamíferos son diferentes, siendo los sacos aéreos óseos aviares (SAOA) la diferencia más notable. La neumatización del húmero en las aves se produce porque el saco aéreo clavicular penetra a través del foramen neumático. El conocimiento actual establece que el proceso de neumatización se inicia desde el primer día de edad y termina a los 43 días, cuando una membrana de "epitelio cúbico plano simple" y tejido conectivo recubre a las trabéculas óseas, y deja un espacio neumático que ocupa casi toda la diáfisis.

Por otro lado, en los humanos el quiste óseo unicameral (QOU) se presenta como una lesión quística ocupada por líquido cetrino. Del 60 al 75% se localizan en la metafisis proximal del húmero y frecuentemente migran a la diáfisis. Histológicamente, las paredes del quiste están tapizadas por una capa de tejido conectivo y células que a veces sugieren ser epiteliales o endoteliales. Hasta ahora no se ha establecido la etiopatogenia del QOU, pero se cree que los factores propuestos no juegan ningún papel importante.

Considerando estos antecedentes, se llevó a cabo un estudio formal para establecer las posibles semejanzas histopatológicas que existen entre los SAOA y los QOU. Los objetivos fueron: a) describir los tipos de células involucrados en la neumatización; b) determinar la estirpe de las células definidas como mesenquimatosas primitivas; c) establecer si en la neumatización participan células epiteliales, endoteliales o mesoteliales; d) investigar las características histoquímicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales de las células que revisten los SAOA; e) y comparar estas mismas características con las del QOU. Para ello se utilizaron los húmeros de 10 pericos frente naranja (Aratinga canalicularis), 8 gallinas Leghorn (Gallus gallus), 11 pavos (Meleagris gallopavo), y 3 martinetes pescadores (Nycticorax nycticorax). De todos los casos se hicieron estudios de histoquímica, aunque solo se practicaron estudios de ultraestructura e inmunohistoquímica en 5 casos de diferentes especies aviares. Se encontró que los húmeros presentaban neumatización, con algunas excepciones, constituida por cámaras aéreas tapizadas por una delgada membrana que ultraestructuralmente era de naturaleza histiocítica y fibroblástica. No se identificó epitelio, endotelio o mesotelio. Los estudios de

inmunohistoquímica dieron resultados negativos, probablemente por razones técnicas.

Se estudiaron las biopsias de 6 pacientes con diagnóstico de QOU, las cuales presentaron prácticamente la misma estructura histológica que los SAOA. Además, la inmunohistoquímica fue positiva para vimentina, lisozima y α -1-AQT, y la ultraestructura demostró células semejantes a fibroblastos y a histiocitos y otras células intermedias entre ambas.

Teniendo en cuenta estas semejanzas, se propone una relación etiopatogénica entre los SAOA y los QOU. Los QOU podrían ser concebidos como un atavismo filogenético, probablemente debido a un fenómeno de expresión atávica de los genes adormecidos de los SAOA. Además, se plantea la necesidad de practicar estudios multidisciplinarios de los SAOA de diferentes especies de aves, para tratar de establecer si su estructura histológica siempre es histiocítica y fibroblástica. Si los resultados pudieran ser confirmados, como lo suponemos, nos autorizarían a descartar el concepto de que los SAOA tienen un revestimiento epitelial o endotelial.

Palabras clave: Quiste óseo unicameral; Sacos aéreos óseos; Aves; Húmero; Ultraestructura; Histoquímica; inmunohistoquímica; Histogénesis; Patogenia; Atavismo; Histiocitos; Fibroblastos; Células intermedias.

**COMPARATIVE STUDY — HISTOCHEMICAL,
IMMUNOHISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL — OF
THE PNEUMATIZED AVIAN HUMERUS
AND THE HUMAN UNICAMERAL BONE CYST**

ABSTRACT:

In the results of recent studies of the human and animal genomes, evolutionary theories have found a definitive support. The evolutive separation between birds and mammals took place around 250 to 300 million years (My) ago, and the separation between mammals and men about 65 to 80 My ago. There are some mutant genes, carriers of permanent heritable changes in the sequence of genomic DNA, which by means of coding abnormal proteins can produce structural corporal malformations.

Avian and mammalian bones are different, the avian bone air sacs (ABAS) being the most important difference. The process of pneumatization of the humerus occurs when the clavicular air sac penetrates through the pneumatic foramen. This process initiates since the first day of age and is over by the 43rd day, when the bone chamber lined by a “simple cubic squamous epithelium” and a thin layer of connective tissue forms a pneumatic space occupying almost the entire diaphysis.

On the other hand, the human unicameral bone cyst (UBC) occurs as a cystic lesion filled with cetrine fluid. Sixty to 75% of UBC are located in the proximal metaphysis of the humerus and they frequently migrate to the diaphysis. Histologically, the walls of the cysts are lined by a layer of connective tissue and cells sometimes suggestive of an epithelium or endothelium. The etiology or pathogenesis of the UBC have not been established until now, but we believe that the proposed factors do not play an important role.

Taking into consideration the aforementioned data, a formal study was carried out in order to establish the possible histopathological similarities between the ABAS and the UBC. The objectives of the study were: a) to describe the types of cells implicated in the pneumatization process; b) to determine the lineage of the cells defined as primitive mesenchymal cells; c) to establish if epithelial, mesenchymal or endothelial cells participate in the pneumatization process; d) to investigate the histochemical, immunohistochemical and ultrastructural characteristics of the cells that line the ABAS; e) and to compare such characteristics with those of the UBC. For such purpose the humeri of 10 parrots (Aratinga canicularis), 8 Leghorn hens (Gallus gallus), 11 turkeys (Meleagris

gallopavo), and 3 night herons (*Nycticorax nycticorax*) were studied. All the cases were studied with histochemical techniques, although only 5 cases of different bird species were adequate for complete immunohistochemical and ultrastructural studies. All the humeri presented pneumatization, with a few exceptions, that were characterized by air chambers lined by a thin membrane which ultrastructurally was of histiocytic and fibroblastic nature. Epithelium, endothelium or mesothelium were not identified. Due to technical problems, the immunohistochemical studies gave negative results.

Six biopsies of patients with the diagnosis of UBC were studied, which showed practically the same histologic structure as the ABAS. Furthermore, the immunohistochemical studies were positive for vimentin, lysozyme and α -1-ACHT, and the ultrastructural studies demonstrated cells resembling fibroblasts and histiocytes and other cells with intermediate features.

Taking into consideration these similarities, we propose an etiopathogenical relationship between the ABAS and the UBC. The UBC could be conceived as a phylogenetic atavism, probably due to a phenomenon of atavistic expression of the dormant genes of the ABAS. In addition, the need for multidisciplinary studies of ABAS from different bird species is proposed, in order to define if their histological structure is always histiocytic and fibroblastic. If those results could be confirmed, as we suspect, they would enable us to discard the concept that the ABAS have an epithelial or endothelial lining.

Key words: Unicameral bone cyst; Avian bone air sacs; Humerus; Ultrastructure; Histochemistry; Histogenesis; Immunohistochemistry; Pathogenesis; Atavism; Histiocytes; Fibroblasts; Intermediate cells.

ESTUDIO COMPARATIVO - HISTOQUÍMICO, INMUNOHISTOQUIMICO Y ULTRAESTRUCTURAL - DEL HÚMERO NEUMATIZADO DE LAS AVES Y EL QUISTE ÓSEO UNICAMERAL DE LOS HUMANOS.

INTRODUCCION

Las teorías fundamentales del pensamiento científico contemporáneo tuvieron un importante desarrollo en el siglo XIX, lo que ha conducido a incrementar el conocimiento de la realidad natural y social que prevalece, y ha ayudado a describir la complejidad del mundo de acuerdo a explicaciones racionales preestablecidas. Este desarrollo abre un espacio de discusión entre dos extremos: el primero mediante la imaginación desbordada que trata de romper las amarras de toda teoría y pensar libremente, por otra el dogmatismo que niega inclusive las teorías de la evolución como una realidad aceptada. Basado en un desarrollo científico es que se acepta actualmente la teoría de la evolución biológica (1). Esto se debe a que no solo la evolución ofrece una explicación coherente a la diversidad biológica, sino que también permite que se puedan practicar comprobaciones científicas de los cambios evolutivos (2). Por ejemplo: los estudios del ADN o genoma de todos los seres vivos que se están haciendo actualmente.

Es importante señalar que la observación de los grandes cambios, que existen entre unas especies y otras, no implica necesariamente que se esté presenciando directamente la evolución en acción. Las ciencias reposan en parte sobre la inferencia, y la evolución no difiere de otras ciencias en este aspecto. Por principio, no se pueden observar procesos que operaron en el pasado, se deben inferir a partir de los resultados que sobrevivieron al paso del tiempo, como son los organismos vivientes y los fósiles. Es en éstos en los que a menudo existen transiciones, como lo es por ejemplo la mandíbula de los reptiles que está formada por varios huesos

mientras que la de los mamíferos tiene solo uno. Los huesos mandibulares de los reptiles se fueron reduciendo paso a paso en los mamíferos a través de la evolución, hasta que se convirtieron en diminutos huecesillos situados en la parte trasera de la mandíbula. En otras palabras, el martillo y el yunque del oído de los mamíferos representan vestigios de los huesos mandibulares de los reptiles (3).

Actualmente, una de las principales áreas de estudio de las ciencias biológicas es el proceso de diferenciación y variabilidad genética, que ha conducido a la diversidad biológica (2). El soporte físico de esa variabilidad son los ácidos nucleicos y proteínas, y su estudio representa la posibilidad de cuantificar la variabilidad genética de una población, como un conocimiento básico para entender el mecanismo evolutivo. Dentro de los genes existen pocos locus polimórficos, los cuales mantienen algunos genes mutantes que confieren a los genotipos que los poseen una baja eficacia biológica. Algunos de estos genes son llamados genes letales" algunos científicos lo denominan "lastre genético o mutacional". Estos propician la aparición continua de genes deletéreos (2).

Se ha descifrado que las mutaciones genéticas determinan cambios estructurales en el ADN, los cuales se traducen en cambios paralelos en las proteínas (4). Cuanto más alejadas evolutivamente estén dos especies, mayor número de aminoácidos diferentes presentará la misma proteína de esas dos especies (4). Utilizando estas diferencias moleculares se pueden construir árboles filogenéticos. Un ejemplo es la aparente constancia del número de sustituciones de aminoácidos por año en líneas filogenéticamente separadas; como es el caso de las cadenas α y β de la hemoglobina, que se codifican actualmente por dos genes que proceden de un solo gen que se duplicó hace unos 450 millones de años (2,3). Estas cadenas polipeptídicas han venido experimentando sustituciones de aminoácidos en distintas especies, a una frecuencia constante de aproximadamente una sustitución en 100 aminoácidos por cada 6 millones de años. Los

vertebrados que han estado sometidos a condiciones adaptativas distintas presentan una constancia en la evolución molecular de la hemoglobina (2). Fueron esas condiciones las que propiciaron una ulterior evolución de la β hemoglobina, proporcionando de esta manera las bases de la clasificación taxonómica de las formas fetal y adulta (3); hemoglobinas que retienen, sin embargo, su funcionalidad a pesar de los cambios experimentados.

Un ejemplo lo constituye el hecho de que la única sustitución diferencial entre el hombre y el gorila (en cuanto a hemoglobina se refiere) se encuentra en la cadena β de la hemoglobina, la cual parece ser específica de especie. La sustitución más próxima produce serias alteraciones patológicas, porque afecta a la estructura del grupo activo hemo (2,3). Así mismo, después de la separación evolutiva de las aves y los mamíferos, se originaron nuevos genes en cada uno de estos linajes a partir del gen de la β hemoglobina ancestral (3). Lo anterior no es de extrañarse, ya que existen estudios extensos en los que se hace referencia a la evolución que ha ocurrido entre las aves y otros mamíferos, incluyendo al hombre (5-8).

Otros trabajos, que se han basado en estudios antropológicos y genéticos, indican que la separación entre aves y mamíferos sucedió hace aproximadamente 250 a 300 millones de años (7), y que la división entre otros mamíferos y los seres humanos a su vez ocurrió hace 65 a 80 millones de años (9). En cuanto a algunos de los estudios de tipo genético se puede citar, por ejemplo, la relación evolutiva que existe entre el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) aviar y el CD1 de los humanos (7). El CD1 de los humanos está más relacionado evolutivamente con el CMH de clase I de las aves, que con cualquier gen de clase I de otros mamíferos (7). Este trabajo sugiere que los genes CD1 divergieron aproximadamente al mismo tiempo que ocurrió la separación de aves y mamíferos, y que la divergencia (del gen ancestral que dio origen a los genes de CMH de clase I de las aves y los del CD1 de los mamíferos), pudo haber ocurrido algún tiempo

antes de la separación de estas dos clases de vertebrados (7). Es posible que un gen homólogo de los genes del CMH de clase I aviar se haya retenido en forma excepcional como un gen no clásico o material genético reprimido en los mamíferos, y que posteriormente dio origen al CD1 de los mamíferos (6), no obstante que en general se ha observado que los genes no clásicos de clase I de origen aviar no se conservan en las diferentes especies de mamíferos (6,7).

Gracias a las teorías de la evolución, y a las ciencias que se le han sumado como la paleontología y la genética, es que se han logrado descubrir los orígenes de los seres vivos, la división de los continentes y el poder reconocer durante el siglo XX especies animales y vegetales que estuvieron presentes hace más de 500 millones de años en la tierra. Estas ciencias han formado las bases para el desarrollo de líneas de estudio; por ejemplo, aquéllas que permitan establecer el origen de enfermedades en el hombre que antes no era posible explicarse, y que ahora se documentan con mayor frecuencia.

El esqueleto de las aves difiere en varios aspectos del esqueleto de los mamíferos. En la gallina doméstica existen solamente centros de osificación primarios en los huesos largos (1). Otra característica específica de los huesos aviares es la producida por las hormonas estrogénicas en las aves, que influyen en el desarrollo del hueso medular especializado en la cavidad medular de muchos de los huesos (11). Sin embargo, la característica más notable es la neumatización de muchos de los huesos, entre los que se encuentran los huesos frontal, parietal, occipital, esfenoides, vértebras cervicales y torácicas y el húmero. El húmero se encuentra neumatizado en el 77% de los casos (12,13), y se neumatiza por medio del saco aéreo claviclar que tiene dos divertículos, el esternocardíaco y el humeral. De este último se origina una rama que penetra en el húmero a través del foramen neumático, que se localiza en la fosa neumática de la superficie medio-ventral de la porción proximal del húmero (9). Sin embargo, sí el saco aéreo no se encuentra en una

posición y tiempo estratégicos, la oportunidad de que el saco aéreo penetre al foramen neumático se pierde, y el hueso permanece sin neumatizarse (13). A esto se debe que exista neumatización bilateral del húmero en solo 62% de los casos (12). El proceso de neumatización implica reabsorción del hueso trabecular y expansión del tejido conectivo quístico (11,14).

En la gallina, el proceso de neumatización se inicia desde el primer día de edad, cuando la médula ósea del húmero se encuentra ocupada por una gran masa cónica de cartílago inmaduro. A los 8 días de edad, la zona distal del cartílago metafisiario de crecimiento forma columnas de cartílago hipertrófico hacia la diáfisis, que producen erosión progresiva y sustitución del cartílago por osteoide. A los 11 días de edad, ocurre una sustitución de la médula ósea hematopoyética por tejidos conectivo y adiposo, los cuales son penetrados por el avance de un complejo vascular, constituido por un plexo de una capa única de células endoteliales con un lumen que mide de 7 a 16 micras de diámetro en sus puntos de invasión más proximal (15). Este plexo se acompaña de un botón mesenquimatoso primitivo, el cual inicialmente forma una hendidura neumática que avanza hacia la epífisis. A los 25 días de edad, la masa de tejido mesenquimatoso erosiona el hueso cortical en la zona central de la diáfisis, por debajo de la línea epifisiaria proximal, y avanza hasta reunirse con la hendidura neumática medular. Este proceso de fusión de las hendiduras neumáticas está guiado por vasos capilares, la continuidad se establece aproximadamente a los 40 días de edad. A partir de los 43 días de edad, se presenta una membrana de "epitelio cúbico plano simple" que descansa sobre tejido conectivo, la cual recubre la cámara producida por la erosión. Esta membrana recubre todas las trabéculas óseas con las que entra en contacto, dejando como resultado un espacio neumático que ocupa casi toda la diáfisis (10).

Para que ocurra el fenómeno de neumatización también es importante que exista una reabsorción simultánea del cartílago, el cual se encuentra parcialmente calcificado. Esto ocurre como resultado de la actividad de por lo menos dos

tipos de células: las primeras corresponden a condroclastos multinucleados o binucleados; las segundas están representadas por células mesenquimatosas mononucleares indiferenciadas, que se localizan perivascularmente y que rodean a la mayoría de los grupos vasculares que invaden al cartílago no mineralizado (15). Ultraestructuralmente se ha observado, que acompañando y precediendo a las células endoteliales se encuentran células electrodensas cuyos procesos citoplasmáticos (que simulan interdigitaciones) penetran en componentes de la matriz cartilaginosa. De hecho, la presencia de algunos procesos celulares con cuerpos parecidos a lisosomas ayudan a sospechar que las células perivasculares probablemente sean de naturaleza histiocítica y que pudieran ser esenciales para la reabsorción del cartílago, a pesar de su estado de mineralización (15).

Por otro lado, el quiste óseo unicameral es una lesión relativamente rara que se presenta en la metáfisis de los huesos largos de humanos en la segunda década de la vida, y que predomina en el sexo masculino (16). Del 60 al 75 por ciento de las lesiones ocurren en la metáfisis proximal del húmero, aunque también se presenta en el fémur, calcáneo y otros huesos. Curiosamente, cuando la lesión quística afecta a los huesos largos como el húmero, con frecuencia migra paulatínamente hacia la diáfisis (17).

La lesión consiste en un quiste de una sola cámara ocupada por líquido cetrino o hemorrágico. Histológicamente, entre los componentes más frecuentes de la pared se identifican: histiocitos, macrófagos con hemosiderina, tejido conectivo bien vascularizado, osteoclastos ocasionales y osteoide reactivo. Solamente cuando el quiste se fractura se presenta reacción perióstica (16-18). La lesión puede fracturarse espontáneamente hasta en un 33 por ciento de los casos, generalmente en la porción proximal del área quística, y cuando se forma el callo de fractura el quiste puede involucionar (19).

Se ha propuesto que el quiste óseo unicameral podría ser el resultado de la degeneración quística de un tumor preexistente, o el producto de la organización de un proceso inflamatorio de progresión lenta (20). Se especula que, combinados estos procesos patológicos con trauma o con la acumulación de líquido intersticial en una zona de tejido fibroso, por medio de una reabsorción ósea rápida se formaría la lesión (16). También se ha sugerido que el quiste óseo unicameral podría tener su origen en tejido semejante a la membrana sinovial (18), la cual nunca ha sido demostrada en localización intraósea. Sin embargo, la localización del quiste óseo unicameral en sitios específicos de huesos como el húmero y el fémur, y la ausencia del quiste en muchos otros huesos, hacen presumir que en su histogénesis y/o patogenia no juegan ningún papel importante los factores propuestos. Además, nunca se ha demostrado la asociación del quiste con procesos neoplásicos o infecciosos, excepto con procesos de cicatrización en las fracturas. Tampoco se han demostrado en los huesos humanos normales restos de tejidos parecidos a los encontrados en el quiste óseo unicameral (17).

En 1993 se realizó un estudio meticuloso en la Unidad de Patología del Hospital General de México de los componentes histológicos de las paredes del quiste óseo unicameral, con el fin de determinar si existía o no un revestimiento específico, así como su tipo, en caso de haberlo, con técnicas de histoquímica, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión (17). Las reacciones de inmunohistoquímica fueron positivas para vimentina, lisozima y α 1AQT. Ultraestructuralmente, se demostró que las paredes estaban formadas por tres tipos de células que se encontraban inmersas en sustancias amorfas que podrían corresponder a mucopolisacáridos ácidos y fibras colágenas. Los tres tipos de células fueron: unas semejantes a fibroblastos con abundantes filamentos intermedios, otras de tipo histiocítico con lisosomas prominentes y finalmente otras células aplanadas que no pudieron ser clasificadas. Este último tipo de células revestían las zonas quísticas, tenían núcleo grande y alargado, sin nucléolo aparente, y solamente presentaban algunas

mitocondrias en los citoplasmas (pues carecían de filamentos intermedios, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi). Las membranas citoplasmáticas presentaban algunas interdigitaciones, aunque no se pudieron identificar complejos de unión; sin embargo, no fue posible demostrar marcadores específicos que permitieran clasificarlas exactamente en alguno de los tipos celulares conocidos (17). Se concluyó que, debido a la simpleza histoquímica, inmunohistoquímica y ultraestructural de la pared de los quistes óseos unicamerales, no se podían obtener datos que permitieran establecer con precisión la histogénesis y/o patogenia de la lesión (16,17). Sin embargo, un hecho que quedó muy claramente establecido por el estudio, fue la falta de revestimiento epitelial o endotelial de los quistes.

Tomando en cuenta todos estos antecedentes se planeó llevar a cabo un estudio formal y metódico, para establecer las posibles semejanzas que guardan los quistes óseos unicamerales y los huesos neummatizados de las aves, por medio de las técnicas de histoquímica, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión, lo cual permitirá plantear y apoyar algunas posibilidades congruentes sobre la histogénesis y/o la patogenia del quiste óseo unicameral, las cuales aún permanecen sin aclararse. Si esto fuera factible, en un futuro quizá se podría pensar en la posible detección y prevención de estas anomalías en el hombre, cuando el genoma humano pueda ser completamente examinado y modificado. Así mismo, resulta interesante el tratar de identificar por medio de inmunohistoquímica y ultraestructura a las células involucradas en la neummatización de los huesos aviares, ya que hasta ahora su origen embrionario y su naturaleza misma son mal comprendidas.

OBJETIVO

- 1) Describir los tipos de células y/o tejidos que se encuentran involucrados en el proceso de neumatización del húmero de las aves.
- 2) Identificar la estructura histológica del complejo vascular del húmero de las aves, aparentemente responsable del proceso de neumatización.
- 3) Determinar la estirpe histológica de las células definidas como células mesenquimatosas primitivas perivasculares, que participan en el proceso de neumatización del húmero de las aves.
- 4) Determinar sí en la estructura histológica de los sacos aéreos óseos de las aves participan células epiteliales, endoteliales o mesoteliales.
- 5) Determinar sí la formación de los sacos aéreos óseos de las aves corresponde a un proceso intrínseco del hueso, que se origina de afuera hacia adentro o que es mixto.
- 6) Determinar las características histoquímicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales de los sacos aéreos óseos aviarios.
- 7) Comparar las características histoquímicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales de los sacos aéreos óseos aviarios con las del quiste óseo unicameral humano.

HIPOTESIS

- a) Los sacos aéreos óseos de las aves carecen de un revestimiento epitelial o endotelial
- b) Las células que componen la pared de los sacos aéreos óseos de las aves son de dos tipos solamente, fibroblástico e histiocítico.
- c) Las células mesenquimatosas primitivas perivasculares que participan en el proceso de neumatización de los huesos de las aves, son intermedias entre fibroblastos e histiocitos o precursoras de ambos tipos de células.
- d) Los componentes celulares del húmero neumatizado de las aves tienen características similares - histológicas, histoquímicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales - a las células que constituyen las paredes de los quistes óseos unicamerales del húmero de los humanos.

MATERIAL Y METODO

A) DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trató de un estudio observacional descriptivo entre varias muestras del hueso humeral de aves domésticas y de vida silvestre desde las dos semanas de edad hasta la edad adulta. Los resultados del estudio se compararon con los resultados de seis quistes óseos unicamerales estudiados con las mismas técnicas.

B) MATERIAL DE OBSERVACION

Se utilizaron los dos húmeros de 10 pericos frente naranja (Aratinga canicularis) de 7 semanas de edad, de 8 gallinas Leghorn (Gallus gallus) de 10 semanas de edad, de 6 pavitos (Meleagris gallopavo) de 4 semanas de edad, de 5 pavos (Meleagris gallopavo) de 10 semanas de edad, y de 3 martinetes pescadores (Nycticorax nycticorax) adultos. Para los estudios del material humano, se obtuvieron los bloques de parafina de las biopsias por legrado de 6 pacientes con diagnóstico de quiste óseo unicameral de los archivos de Patología Quirúrgica de la Unidad de Patología del Hospital General de México y de la Facultad de Medicina, UNAM, estudiados de 1974 a 1990.

C) METODO

A las gallinas Leghorn (Gallus gallus) se les vacunó contra bronquitis infecciosa por vía ocular al día de edad. A los dos días contra enfermedad de la Bolsa de Fabricio por vía ocular. A los 7 y 28 días de edad se les vacunó contra la enfermedad de Newcastle, por vía ocular y emulsionando la vacuna en el agua de bebida. Se sacrificaron por medio de una inyección de pentobarbital sódico por vía intravenosa a las 10 semanas de edad. A los pavos (Meleagris gallopavo) se les aplicó por aspersión una vacuna liofilizada de bacterias al día de edad; a los 8 días de edad se les vacunó contra enfermedad de

Newcastle por vía ocular; y a los 21 días se les aplicó la vacuna triple contra enfermedad de Newcastle, Escherichia coli y Pasteurella por vía subcutánea y la de viruela por punción del ala. A las 4 semanas de edad se sacrificaron 6 pavitos por medio de una inyección de pentobarbital sódico por vía intravenosa. A los otros 5 pavos se les aplicó la vacuna de enfermedad de Newcastle por aspersión en gota gruesa a las 8 semanas de edad; a las 10 semanas se les sacrificó por medio de una inyección de pentobarbital sódico por vía intravenosa.

Los pericos frente amarilla (Aratinga canicularis) se mantuvieron en una jaula sin aplicación de ninguna vacuna y se les sacrificó a las 7 semanas de edad en una campana de sacrificio por medio de inhalación de cloroformo. Los martinetes pescadores (Nyctycorax nycticorax) fueron donados por el Zoológico de Chapultepec y se les sacrificó con una inyección de pentobarbital sódico por vía intravenosa.

De cada ave se obtuvo el húmero de ambas alas mediante disección completa incluyendo la epífisis con los cartílagos articulares. Se hizo una disección de los huesos para quitar todos los músculos y las inserciones tendinosas, para proceder a fijarlos por inmersión en formalina amortiguada al 10% , teniendo la precaución previa de inyectar el mismo fijador en la cámara de neumatización a través del forámen neumático. Los especímenes se fijaron durante 72 horas, sin embargo, las primeras 24 transcurrieron en refrigeración a 4°C para evitar la autólisis (Figs. 1 y 2).

A los huesos se les efectuó aseo mecánico con agua corriente, posteriormente se trataron con una solución descalcificadora que se preparó agregando 32 ml de formol al 37%, 28 ml de ácido nítrico y agua destilada cuanto baste para 40 ml , utilizando un volumen de solución descalcificadora aproximadamente 10 veces superior al del volumen óseo (21). La permanencia de los tejidos en la solución para descalcificar se llevó a cabo hasta lograr la consistencia adecuada para la microtomía (de dos a cuatro días). Se lavaron los huesos nuevamente con agua corriente durante 12 horas, con el fin de

eliminar el exceso de la solución descalcificadora. Una vez neutralizada la acidez de los huesos, los húmeros de aves fueron seccionados longitudinalmente para posteriormente cortar una de las mitades en forma transversal y se incluyeron completos en bloques de parafina para obtener secciones histológicas de 4 micras de espesor.

D) TECNICAS DE HISTOQUIMICA

Con los bloques de parafina de cada caso se practicaron múltiples cortes histológicos, mismos que se procesaron con las tinciones siguientes: (21)

- 1) Hematoxilina y eosina.
- 2) Tinción tricrómica de Massón.
- 3) Acido peryódico de Schiff.
- 4) Hierro coloidal de Hale.
- 5) Tinción de Retículo de Wilder.

E) TECNICAS DE INMUNOHISTOQUIMICA

De los bloques de parafina de 5 casos (dos martinetes pescadores, un pavito, una gallina y un perico) (Tabla 3) se seleccionó un bloque para practicar técnicas de inmunoperoxidasa con el método de complejos avidina-biotina (ABC), estandarizado en el laboratorio de inmunohistoquímica de la Unidad de Patología del Hospital General de México, y de la Facultad de Medicina, UNAM. Se siguieron los siguientes pasos: los cortes histológicos se desparafinaron con calor en una estufa (Dry Type Bacteriological Incubator) a 60°C durante 2 horas y media, se terminó la desparafinación en varios cambios de xilol para eliminar los restos de parafina. Los cortes se rehidrataron y se colocaron en vasos de Koplín con peróxido de hidrógeno al 3% y metanol absoluto en una solución 1:4. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario, para inhibir la peroxidasa endógena, en una cámara húmeda durante 24 horas a 4°C. Los grupos de anticuerpos primarios que se utilizaron fueron los siguientes (Tabla 4): a) Marcadores epiteliales: citoqueratina Hospital General

(CKHG), citoqueratina de amplio espectro (KAE), cocktail de citoqueratinas de bajo y alto peso molecular (AE1-AE3), antígeno de membrana epitelial (AME), antígeno epitelial (AgE), antígeno epitelial luminal (AgEL); b) Marcador para fibroblastos Vimentina (Vim); c) Marcadores para histiocitos: lisozima (muramidasa) (Lis), alfa 1-antitripsina (α 1-AT), alfa 1-antiquimotripsina (α 1-AQT); y d) Marcadores para vasos y células endoteliales: colágena de tipo IV (Col IV), Ulex europeus (Ulex), antígeno relacionado con el factor VIII (FVIII). Todos los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron preparados para uso en tejidos humanos, y prácticamente todos fueron de la casa Dako, la cual elabora un catálogo en donde se establece cuales son los anticuerpos que resultan positivos en las diferentes especies animales.

Posteriormente a los cortes se les efectuó lavado en una solución amortiguada de fosfato salino (0.05 molar) y se incubaron con el puente inmunológico biotinilado correspondiente, durante 30 minutos. Inmediatamente después se sometieron a incubación otros 30 minutos con avidina-biotina conjugada a peroxidasa. Por último, los cortes fueron revelados con una sustancia cromógena, Diaminobencidina (25 mg en 100 ml de solución amortiguada de fosfato salino a un pH de 7.6, a la cual se le agregaron 0.6 ml de agua oxigenada al 3%).

Los cortes se contrastaron con una tinción nuclear, hematoxilina de Harris. Las laminillas se montaron con resina sintética, y se les etiquetó con su número de estudio y el tipo de anticuerpo primario utilizado. Fueron observados al microscopio para una evaluación meticulosa de los resultados de las inmunotinciones. Se interpretaron como positivas a las células que presentaron filamentos intracitoplasmáticos de color café tabaco, reforzamiento de la periferia celular de este mismo color o inmunotinción citoplasmática difusa. El estudio se interpretó como negativo cuando las células no presentaron ninguno de estos datos de inmunotinción.

Para cada uno de los anticuerpos empleados se utilizó un testigo positivo, que correspondió a un corte de tejido en donde la reacción que se buscó debía ser intensamente positiva. Así mismo, con cada caso se corrió un testigo negativo, que consistió en una laminilla con un corte del caso estudiado, en la cual en lugar de aplicar un anticuerpo primario se le colocó suero normal de conejo.

* Dako Corporation, 6392 Via Real, Carpinteria, CA , USA

F) MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Para los estudios de microscopía electrónica fueron obtenidas muestras de tejido de las paredes de los sacos aéreos óseos aviares de las siguientes especies animales: dos pavos, una gallina de engorda raza Leghorn, un perico australiano, y dos martinetes pescadores. Se fijaron intactos durante 4 días en formalina al 10% amortiguada con buffer de fosfatos, y posteriormente fueron descalcificados de acuerdo al procedimiento que antes se mencionó. Cuando la descalcificación fue adecuada, se refecturaron cortes longitudinales de los húmeros para exponer las áreas correspondientes a los sacos aéreos, y por medio de cortes transversales al eje mayor del hueso se tomaron muestras representativas de la pared misma de los sacos aéreos, cuando éstos estaban plenamente formados, o de la zona donde deberían de encontrarse en el caso de que no se hubieran formado todavía. La muestra representativa de la pared sirvió para obtener cubos de tejido de un milímetro cúbico, que incluían desde la pared luminal del saco hasta su pared opuesta en relación al hueso regional.

De cada uno de los bloques de parafina de 6 casos de quistes óseos unicamerales de humanos, se tomó una porción de tejido que después de desparafinarla se seccionó en cubos de un milímetro por lado.

Los cubos de tejido de aves y de humanos se postfijaron en tetraóxido de osmio al 2% en solución amortiguada de fosfatos a 0.1 molar a 4°C por 24 horas. Los cubos de tejido se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente y fueron incluidos en Poly/Bed 812, después de un paso previo en una mezcla de óxido de propileno y el mismo tipo de resina. Para polimerizar los cubos se incubaron durante 24 horas a 60°C. Se tallaron las pirámides, fueron practicados cortes semifinos que se tiñeron con azul de toluidina. Con los cortes semifinos se seleccionó las áreas representativas para la elaboración de los cortes finos. Los cortes finos se tiñeron con una doble tinción de acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes finos se estudiaron en un microscopio electrónico

Carl Zeiss modelo 900, donde se tomaron un número importante de campos representativos a diferentes aumentos. Posteriormente, se prepararon impresiones en papel a partir de los negativos que se habían obtenido durante la observación.

G) OBSERVADOR

Los observadores, de parte o de todo el material de estudio, fueron un Maestro en Ciencias Veterinarias en el área de Patología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; un Patólogo especialista en Patología Quirúrgica Humana del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM y del Hospital General de México; un Químico Farmaco-Biólogo especialista en microscopía electrónica de transmisión; un Biólogo y Técnico en Histología especialista en técnicas de inmunohistoquímica; y la alumna de maestría responsable de este trabajo.

RESULTADOS

ESTUDIOS HISTOQUIMICOS:

Las diferentes tinciones que se utilizaron en los cortes histológicos en general mostraron lo mismo, en cuanto a las estructuras óseas normales y en cuanto a los sacos aéreos que son el motivo de este estudio

CARACTERISTICAS GENERALES:

Todos los húmeros estudiados se pudieron dividir en dos grandes grupos: a) huesos sin formación de cámaras neumáticas, y b) huesos con formación de cámaras neumáticas. Los huesos sin formación de cámaras neumáticas presentaban exclusivamente las estructuras histológicas del hueso y de las articulaciones normales, como son: cartílago articular, cartílago de crecimiento, osificación endocondral, hueso cortical, hueso esponjoso o trabecular, médula ósea, tejido adiposo del canal medular, cápsulas articulares y tendones. En estos huesos se buscaron intencionadamente la formación incipiente de cámaras neumáticas, pero no se logró identificarlas ni con la tinción de rutina ni con las tinciones especiales. Tampoco se encontraron vestigios de que hubieran existido y hubieran involucionado, como podrían ser áreas de fibrosis, tejido de granulación o cambios en la estructura ósea normal.

En los huesos con formación de cámaras neumáticas la estructura del hueso en general estaba preservada, sin embargo a nivel de la metáfisis ósea, y en algunos casos desde la epífisis, y de la diáfisis proximal, se encontraba la presencia de una cámara neumática. Estas cámaras en general eran únicas, aunque por la presencia de septos incompletos que se formaban en las paredes podían aparecer como múltiples. El contorno de las paredes no era regular, sino que estaba excavado en el hueso normal y de ese hueso hacían protrusión hacia la luz una serie de espículas óseas que formaban estructuras parecidas a tabiques o septos

incompletos. Por lo tanto, el contorno de las cámaras era anfractuoso, cuando menos bidimensionalmente que es como lo permiten apreciar los cortes histológicos, lo que propiciaba que la membrana que revestía a las cámaras también lo fuera (Figs. 3 y 4). La pared de las cámaras estaba compuesta por los siguientes elementos: espículas óseas, bandas de tejido fibroso y una membrana. Las espículas óseas en general se orientaban paralelas a la pared de la cámara neumática, aunque en las salientes o tabiques que antes se describieron, se disponían en forma perpendicular a la pared de la cámara. El tejido conectivo, en general, seguía el contorno de la cámara, se asentaba siempre entre la espícula ósea y la membrana que a continuación se describirá (Figs. 5 y 6). El espesor del tejido conectivo era variable, en algunos sitios no se podía identificar, en la mayoría de las paredes apenas era perceptible, y en pocos sitios tenía un espesor considerable. (Fig 7). Finalmente, la cámara presentaba un revestimiento continuo que se podría etiquetar como una membrana (Figs. 5 y 6). Esta membrana variaba considerablemente en su espesor, pues frecuentemente parecía formada por una sola fila de células, aunque en algunos sitios tenía varios estratos de células en su composición. Las células eran fusiformes, ovoides y raramente poligonales; sugerían más a células endoteliales que a células epiteliales (Fig. 8). En las membranas compuestas por varios estratos de células, como en las gallinas (Gallus gallus), las células eran fusiformes en la porción profunda y poligonales en la porción superficial. Fundamentalmente la tinción de PAS permitió ver que algunas de las células superficiales tenían el aspecto de histiocitos o macrófagos, porque los citoplasmas con gránulos positivos en general corresponden a la presencia de lisosomas (Fig 8). Ni con la tinción de PAS ni con la tinción de hierro coloidal se pudieron observar estructuras que fueran compatibles con una chapa de tipo epitelial o sustancias de tipo mucopolisacáridos (que casi siempre corresponden a antígenos tumor-específicos) que sugirieran una diferenciación epitelial. Por lo tanto, cuando menos histoquímicamente, no se encontró evidencia de que la membrana que tapizaba a los sacos aéreos óseos tenga una

naturaleza epitelial. Además, las células que componían la membrana siempre se encontraban separadas entre sí, sin formar mosaicos, sugiriendo que no estaban unidas por complejos de unión. (Cuadro 1).

CARACTERISTICAS ESPECIFICAS:

PAVOS (*Meleagris gallopavo*): Incluidos en el estudio quedaron 6 pavos de 4 semanas de vida y dos pavos adultos de 10 semanas. Los pavos de 4 semanas no presentaron formación de cámaras neumáticas, ni siquiera hubieron indicios de una formación incipiente. Por otro lado, en uno de los pavos adultos tampoco se encontró la formación de cámaras neumáticas, mientras que en el otro si hubo presencia de neumatización (Figs. 4 y 7). Los húmeros estudiados sin neumatización eran histológicamente normales.

PERICOS FRENTE NARANJA (*Aratinga canalicularis*): En esta especie se encontró una importante neumatización del hueso, siendo la peculiaridad más sobresaliente la delgadez de la membrana interna, que generalmente estaba constituida por una sola capa de células. Las tinciones histoquímicas empleadas no contribuyeron a poder estudiar mejor membranas tan delgadas y tan simples en su composición.

GALLINAS LEGHORN (*Gallus gallus*): En esta especie también se presentó una franca neumatización del hueso, con algunas particularidades (Figs. 5 y 6). Las cámaras neumáticas estuvieron frecuentemente septadas o tabicadas parcialmente, la membrana interna era gruesa y estaba constituida por varias capas de células y la capa de tejido conectivo era aparente y gruesa (Fig. 8). En algunos sitios el espesor del tejido conectivo era superior al de la membrana interna. Un solo animal de esta especie no presentó neumatización del hueso.

MARTINETE PESCADOR (*Nycticorax nycticorax*): En esta especie todos los animales presentaron neumatización, las cámaras se encontraban tabicadas o septadas parcialmente y

la membrana interna era muy delgada (Fig. 3). En algunos sitios no se podía identificar la membrana, probablemente debido a que se despegó del corte o a su delgadez; en algunos animales la membrana era más visible con las tinciones especiales, como el tricrómico de Masson y la tinción para retículo. La membrana interna, en general, parecía estar constituida por una sola capa de células, y el tejido conectivo subyacente era muy escaso o probablemente inexistente.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUIMICOS:

Desgraciadamente Los resultados de los estudios de inmunohistoquímica fueron malos, porque ninguno de los 5 casos estudiados y ninguno de los anticuerpos utilizados dieron resultados positivos.

ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES:

Se estudiaron 6 casos de sacos aéreos óseos correspondientes a las siguientes especies: dos pavos (Meleagris gallopavo), dos pericos frente naranja (Aratinga Canicularis), una gallina de engorda Leghorn (Gallus gallus) y un martinete pescador (Nycticorax nycticorax). La composición histológica de la pared de los sacos era muy homogénea y relativamente simple; por lo tanto, al estudiar una pequeña zona de la pared se estaba estudiando la composición histológica de toda la pared. Los resultados del estudio ultraestructural se dividen en dos fases: en la primera se describen los hallazgos comunes a todas las especies estudiadas, en la segunda fase se describen los resultados aparentemente específicos para la especie estudiada (Cuadro 2).

CARACTERISTICAS GENERALES:

La composición ultraestructural de la pared de los sacos aéreos óseos resultó ser, hasta cierto punto relativamente simple. Desde la luz hasta el hueso subyacente siempre fue posible encontrar que la pared estaba constituida por un reducido número de capas de células, que podían variar desde dos hasta ocho capas (Figs. 9 y 10). Se debe señalar que las capas profundas en general estaban formadas por células alargadas y delgadas, que siempre parecían corresponder a fibroblastos. Los citoplasmas de las células presentaban muy pocos organitos celulares, especialmente retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias (Figs. 9,10). En algunas de estas células también se observaron escasos lisosomas, dando la impresión de que pudiera tratarse de células intermedias entre fibroblastos e histiocitos, que son las células que se describen a continuación (Figs. 11, 12 y 13). La porción superficial o luminal de la pared de los sacos aéreos, estaba compuesta por células mucho mas grandes que las profundas, con abundante citoplasma claro o electrodenso, en el cual fue posible identificar cantidades variables de lisosomas. Los núcleos también eran más grandes que los de los fibroblastos, frecuentemente ovoides, con mezclas de heterocromatina y eucromatina, y nucléolos a veces aparentes. Además de los

lisosomas fue posible identificar mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y vesículas inespecíficas. Estas células parecían corresponder a histiocitos o macrófagos (Figs. 14 y 15), porque su membrana citoplasmática algunas veces se prolongaba a manera de filopodia tanto en la superficie luminal como en la superficie profunda (Figs. 9 y 14). En ninguna de estas células, superficiales o profundas, histiocíticas o fibroblásticas, fue posible identificar membranas o láminas basales. Solamente en una especie animal, en el perico frente amarilla, se pudieron identificar focalmente complejos de unión simples entre células de aspecto histiocítico. En forma resumida se puede concluir: que con estos estudios se demostró que las membranas limitantes perimetrales de los sacos aéreos de las aves carecían de revestimiento epitelial, mesotelial o aún endotelial (Cuadro 2).

CARACTERISTICAS ESPECIFICAS:

PAVO NUMERO UNO:

El estudio ultraestructural de este caso mostró la complejidad histológica más importante, ya que el número de capas de células fue el mayor (hasta 8) (Fig 11). Las células fibroblásticas de la profundidad eran muy largas, pues frecuentemente no cabían en un campo de bajo aumento, y presentaban escasa cantidad de citoplasma. Los núcleos mostraban una mezcla equilibrada de eu y heterocromatina o francamente eran electrodensos. Esta variación de la afinidad por los metales pesados que se usan para la tinción, podría ser artificial y deberse al proceso de descalcificación. Las células fibroblásticas, a su vez, se encontraban separadas entre sí por bandas de fibras colágenas de diferente espesor (Fig. 11). Las células superficiales de esta especie mostraban la filopodia más importante, lo cual las caracterizaba como células de tipo o de origen histiocítico. También gracias a posibles artificios de la tinción, fue posible observar mejor los lisosomas de las células histiocíticas. En esta especie, o en este caso en particular, la separación entre las células fibroblásticas e histiocíticas fue muy clara, aunque focalmente

había estratos de células con características intermedias (Fig. 11).

PAVO NUMERO DOS:

El espesor de la pared estaba compuesto por un número de capas de células que podían alcanzar hasta 6 (Fig. 9). Las células profundas, en esta especie, eran definitivamente de aspecto fibroblástico, por ser alargadas, delgadas y simples en su núcleo y en su citoplasma. No fue posible identificar filamentos intermedios en el citoplasma, que deberían corresponder a vimentina, quizá por el proceso de descalcificación (Figs. 9 y 10). En cambio las células superficiales, que podían abarcar de dos a tres estratos, también podían ser consideradas como histiocitos. Los citoplasmas eran abundantes, presentaban variable electrodensidad, numerosos lisosomas y vacuolas citoplasmáticas (Fig 10). También fue posible identificar abundante filopodia a lo largo de las células de la superficie luminal, que alternaba con material electrodensito amorfo (Figs. 9 y 14). En las células superficiales los núcleos eran más grandes y vesiculosos y estaban dotados de nucléolo prominente (Figs. 10 y 14). Separando a los diferentes estratos de células se encontraban haces de colágena de diferente espesor (Fig.10). Solamente en un sitio se observaron dos estructuras que remotamente podrían corresponder a complejos de unión, aunque no del tipo de los desmosomas (Fig. 9).

PERICO NUMERO UNO:

Las células superficiales y profundas fueron menos histiocíticas y menos fibroblásticas, pues ni las superficiales presentaban los marcadores de los histiocitos ni las profundas eran alargadas y simples como los fibroblastos. Podría decirse que había cierto parecido entre las células superficiales y las profundas, pues ambas presentaban núcleos ovoides, mezcla balanceada de eu y heterocromatina, nucléolos pequeños o

inaparentes, y citoplasmas con muy pocos organitos celulares, por lo que deben ser consideradas como células intermedias (Fig 12). Una mayor cantidad de fibras de colágena se encontraban separando a las diferentes capas de células.

PERICO NUMERO DOS:

La conservación de este tejido no fué óptima, por lo que la interpretación tuvo importantes limitaciones. La separación entre las células superficiales y profundas no fue clara, por lo que fue difícil establecer el número de capas de células que componían la pared. Sin embargo, no parecía haber más allá de 5 capas. Las células superficiales fueron más francamente histiocíticas, aunque el citoplasma no era abundante y los probables lisosomas presentes eran pequeños. Las células profundas tenían un aspecto fibroblástico menos franco, los núcleos eran más anchos que los de los fibroblastos habituales y presentaban nucléolo. Podría decirse que en esta especie era menos clara la diferenciación fibroblástica e histiocítica, y que era más aparente el aspecto de las células intermedias.

MARTINETE PESCADOR:

La conservación del tejido de este caso fue relativamente buena y permitió observar ciertas características distintivas. Probablemente en este caso las células superficiales tenían el aspecto o la diferenciación histiocítica más característica, pues los citoplasmas eran abundantísimos y estaban repletos de lisosomas y mitocondrias pequeñas y redondas. La heterogeneidad del citoplasma, alternando codo con codo zonas electrodensas con zonas electrolúcidas, probablemente fué de lo más característico (Fig. 15). Las células profundas eran definitivamente fibroblásticas, aunque alternaban con otras células con diferenciación histiocítica incipiente, lo que sugiere que podría tratarse de células intermedias entre ambas. Una sola célula, que no fue francamente ni superficial ni profunda, presentaba su citoplasma ocupado por

láminas concéntricas de retículo endoplásmico rugoso. Este tipo de células solo se encontró en este caso.

GALLINA LEGHORN:

La composición ultraestructural de la pared estuvo dada también por células que se podrían clasificar como fibroblastos e histiocitos. Sin embargo, hay que hacer notar que prácticamente no se identificaron fibroblastos delgados o fibrocitos, que se caracterizaran por escaso citoplasma y núcleos simples alargados. La mayoría fueron fibroblastos de núcleos ovoides y alargados, dotados de mayor cantidad de citoplasma, con heterocromatina en grumos marginada hacia la membrana nuclear y nucléolos pequeños. Los histiocitos, por otro lado, no fueron de gran tamaño, aunque sí presentaron el citoplasma repleto de los organelos que les son característicos (Fig. 13). En este caso hay que señalar que fue posible identificar en la pared, y alternando con las otras células, a un número significativo de células cebadas. La cantidad de colágena que separaba a las diferentes capas de células fue variable.

RESULTADOS DE QUISTES OSEOS UNICAMERALES HUMANOS:

En el trabajo de tesis realizado por Contreras (17), en el cual se realizó un estudio histoquímico, inmunohistoquímico y ultraestructural de 6 quistes óseos unicamerales de humanos, se observó que éstos se localizaban en la metáfisis proximal del húmero y del fémur (Figs. 16,17,18 y 19).

Con técnicas de histoquímica se encontró que con la tinción de hematoxilina y eosina la pared de los quistes estaba revestida por tejido conectivo bien vascularizado, osteoide reactivo, histiocitos, osteoclastos y macrófagos con hemosiderina. (Figs.20,21) Con la tinción tricrómica de Masson se observó que en la pared de los quistes resaltaba un armazón rico en colágena, en el que sobresalían células fucsínofilas que en algunos sitios se condensaban y revestían pequeñas áreas de la superficie. (Figs. 22,23) La tinción de ácido peryódico de

Sciff (PAS), fue positiva solamente en el citoplasma de algunas células que mostraban aspecto histiocítico.

Las reacciones de inmunohistoquímica resultaron positivas para vimentina, tanto en las células del estroma semejantes a fibroblastos como en las de la superficie de la pared quística; las células de aspecto histiocítico, donde quiera que estuvieron ubicadas, fueron positivas para lisozima y α 1 AQT. Todos los marcadores para las células epiteliales (AME, AE1- AE3 y CKE) resultaron negativos en las células que revisten algunas áreas de la superficie de las zonas quísticas y en las del estroma (Figs. 24,25)

El estudio de ultraestructura demostró la presencia de algunas células aplanadas que revestían ciertas áreas de la superficie de los quistes, las cuales tenían un núcleo grande y alargado y un citoplasma con escasos organelos (Fig. 26). Aunque estas células resultaron parecidas a las células endoteliales, no se pudo demostrar en ellas la presencia de cuerpos de Weibel-Palade, pinocitosis u otros marcadores de células endoteliales. En el estroma de la pared fue posible encontrar numerosos fibroblastos dotados de retículo endoplásmico rugoso abundante y aparato de Golgi. La colágena era de aspecto normal. Así como el osteoide y los vasos sanguíneos.

DISCUSION

Este trabajo de investigación básica biomédica, planeado para tratar de demostrar anatomopatológicamente que los sacos aéreos óseos de los huesos de las aves podrían dar lugar vestigialmente a los quistes óseos unicamerales de los humanos, se concibió bajo tres hipótesis de trabajo condensadas. La primera, y quizá la más importante, está basada en el conocimiento actual del genoma humano y el de otros animales, que ha establecido que las diferentes especies animales comparten en un alto porcentaje el mismo genoma. Así, por ejemplo, se encontró que el genoma humano está contenido en aproximadamente 30,000 genes, de los cuales el hombre comparte un 10% con casi todos los animales del planeta (genes que codifican los bloques básicos de la vida), solamente son 2 a 3 veces más numerosos que los genes de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), y apenas superan por unos cuantos cientos a los genes del ratón. Por si esto fuera poco, el *Homo sapiens* comparte un 98% de su genoma con el chimpancé, y a nivel genético existen muchas más diferencias entre los chimpancés y los otros monos que entre los chimpancés y el hombre. Una manifestación práctica de esta situación la constituye el hecho de que la vimentina y las citoqueratinas de todas las especies animales son bioquímica e inmunológicamente iguales, lo cual demuestra que el ADN que las codifica es igual, sin importar la especie animal de donde provengan los fibroblastos y las células epiteliales que las sintetizan y las portan. Por otro lado, dependiendo de la especie animal, una parte del genoma se expresa permanentemente, otra parte se expresa temporalmente (como para producir normalmente el antígeno carcinoembrionario en el hombre durante la vida embrionaria y fetal y después ya no hacerlo el resto de la vida, excepto en condiciones neoplásicas), y otra parte del genoma no se expresa nunca o se encuentra reprimido en condiciones normales. Sin embargo, existen numerosos ejemplos de que ese genoma reprimido se puede expresar en condiciones patológicas: a) la hipertricosis generalizada congénita humana (hombres lobo), que puede imitar el pelaje de los animales; b)

los hemangiomas capilares o manchas en "vino oporto" humanos, también considerados como nevos vasculares, que reproducen el plexo capilar cutáneo de animales que no tienen pulmones y que respiran por la superficie corporal, como la salamandra (22,23); c) los nevos intradérmicos cutáneos humanos, que son morfológicamente iguales a las manchas táctiles de los reptiles y los anfibios, como los cocodrilos de la especie *Alligator mississippiensis* (22,24); d) el paraganglioma gangliocítico del duodeno humano, que se ha propuesto que representa un proceso hamartomatoso derivado del páncreas ventral primitivo (25) ; e) el teratoma fetoide ovárico humano u homúnculo (26), que resulta de la expresión casi total y organizada del genoma de una célula germinal neoplásica. En otras palabras: el genoma humano tiene el potencial de expresar o condicionar la formación de estructuras (idénticas o parecidas) que fueron (o que son) normales en especies animales diferentes al hombre.

La segunda hipótesis de trabajo, cuestiona seriamente que la estructura histológica permanente de los sacos aéreos óseos aviares sea tal y como se la describe en los trabajos de Aranda (10) y Howlett (15), sobre el proceso de neumatización del húmero y la tibia de la gallina doméstica. Estos autores describieron que la neumatización de los huesos ocurre: a) por aparición de cartílago hipertrófico en la diáfisis, que paulatinamente es sustituido por osteoide; b) por sustitución de la médula ósea hematopoyética por tejidos conectivo y adiposo; c) por penetración a la zona neumatizada de un complejo vascular, el cual está constituido por una capa única de células endoteliales y de un tejido mesenquimatoso primitivo; y d) finalmente, por una fusión de la cámara formada por el complejo vascular con la hendidura neumática medular, la cual termina recubierta por una membrana de "epitelio cúbico plano simple" que descansa sobre tejido conectivo. Esencialmente proponen, y es lo que se cuestiona, que células de origen endotelial terminen recubriendo en forma permanente a los sacos aéreos como un "epitelio cúbico plano simple."

La tercera hipótesis de trabajo, considera que existe una alta probabilidad de que los quistes óseos unicamerales humanos puedan representar vestigios atávicos de los sacos aéreos óseos de los huesos de las aves, tomando en cuenta los siguientes hechos: a) los quistes óseos unicamerales se presentan hasta en un 75% en la metáfisis proximal del húmero de los humanos; b) los quistes óseos unicamerales migran de la metáfisis a la diáfisis humeral; c) los quistes óseos unicamerales tienen una composición histológica demasiado simple, aunque muy parecida a la de los sacos aéreos óseos cuando se estudian ambos con técnicas de rutina; y d) que no se ha podido ofrecer hasta ahora una explicación razonable a la histogénesis y/o patogenia de los quistes óseos unicamerales, ya que todas las hipótesis propuestas son muy simples y no cuentan con ningún apoyo de tipo clínico o experimental.

Una de las conclusiones más importantes de este trabajo fue que no se pudieron corroborar los hallazgos histológicos descritos por Aranda (10) y Howlett (15), aunque hay que admitir que los objetivos de este trabajo no incluían repetir estos meticulosos estudios. Probablemente no se pudieron demostrar los cambios histológicos de la neumatización del húmero de las aves, porque las diferentes especies animales que se utilizaron para este trabajo fueron de animales adultos, excepto 6 pavitos de 4 semanas de edad. Sin embargo, es preciso señalar que ni aún en esta edad fue posible confirmar algunos de los hallazgos descritos, los cuales pudieron haber sido: erosión del hueso cortical por tejido mesenquimatoso primitivo, fusión de las cámaras y, sobre todo, revestimiento de la cámara única por un "epitelio cúbico plano simple." Es necesario aclarar, adicionalmente, que los epitelios simples (o de una sola capa de células) pueden ser planos, cúbicos o columnares, pero no pueden ser cúbicos y planos al mismo tiempo, como se dice que era el epitelio que se encontró recubriendo a los sacos aéreos óseos. De cualquier manera, ni epitelio plano ni epitelio cúbico fueron identificados en el revestimiento de los sacos aéreos óseos en este estudio.

Es probable que parte de la explicación a los diferentes hallazgos histológicos de los tres trabajos, resida en el hecho de que Aranda (10) y Howlett (15) utilizaron gallinas y en este trabajo, además de gallinas, martinets y pericos se usaron pavitos. Esta especie aviaria doméstica probablemente ya no desarrolla siempre sacos aéreos en los huesos largos, porque se ha convertido en un animal que ocasionalmente vuela. No obstante, que probablemente por la edad de los animales estudiados no se pudo presenciar el proceso de desarrollo de los sacos aéreos óseos, uno de los hallazgos más importantes de este trabajo es la demostración de que los sacos aéreos óseos de las diferentes aves estudiadas, incluídas las gallinas, carecen de un revestimiento epitelial o endotelial. Otros autores (12,13) también han aseverado que existe un revestimiento epitelial o endotelial en los sacos aéreos óseos, al cual lógicamente lo conciben como una extensión de los sacos aéreos claviculares, que después de penetrar a través del foramen neumático termina por colonizar la médula ósea neumatizada. Esta popular impresión de que los sacos aéreos óseos cuentan con un revestimiento epitelial y mesenquimatoso, sin embargo, fue obtenida por medio de estudios morfológicos de rutina. No se ha podido localizar ningún estudio donde la presencia del supuesto revestimiento epitelial se haya demostrado por medio de inmunohistoquímica o microscopía electrónica. Por lo tanto, ya que en este estudio sí se practicaron técnicas ultraestructurales, es posible y razonable aseverar que los sacos aéreos de los húmeros de las aves carecen de un revestimiento epitelial o endotelial.

Fundamentalmente por los resultados de los estudios de ultraestructura, de todas las especies utilizadas para este trabajo, se encontró que la composición histológica de la membrana que reviste a los sacos aéreos óseos es relativamente simple. En la porción superficial, en relación a la luz del saco, se encontraron células de tipo histiocítico, con una forma poligonal e incluso epitelioides, cuyo marcador citoplasmático resultaron ser múltiples lisosomas. Estos histiocitos generalmente formaban una sola capa de células, aunque en casos extremos, como en los pavos, podían formar

hasta dos o tres capas. Las células que se encontraron en la parte profunda de la membrana se identificaron como fibroblastos, pues eran células alargadas de núcleos delgados con extremos puntiagudos, cuyo marcador citoplasmático correspondió a retículo endoplásmico rugoso. Los fibroblastos formaban siempre más capas que los histiocitos, y cuando éstos llegaban a formar más de una capa alternaban con ellos.

Ultraestructuralmente, no quedó ninguna duda de que la composición morfológica de la membrana era histiocítica y fibroblástica, y vale la pena enfatizar que nunca se encontraron indicios morfológicos de que pudiera ser epitelial. Hubiera sido muy importante demostrar con reacciones negativas para marcadores inmunohistoquímicos la ausencia de epitelio o endotelio (citoqueratinas, antígeno de membrana epitelial, antígeno epitelial y antígeno epitelial luminal para el epitelio; colágena de tipo IV, antígeno relacionado con el factor VIII y Ulex europeus para endotelio), así como la positividad de los marcaforos histiocíticos (lisozima, α 1-antitripsina y α 1-antiquimotripsina) y del marcador fibroblástico (vimentina). Sin embargo, por razones que no se pudieron determinar con precisión, los estudios de inmunohistoquímica resultaron negativos para todos los anticuerpos empleados. Dicho de otra manera, de acuerdo a los hallazgos ultraestructurales: los histiocitos pudieron haber dado positivos en las reacciones para lisozima, α 1-antitripsina y α 1-antiquimotripsina; los fibroblastos debieron ser positivos para vimentina. El resto de las reacciones debieron haber sido negativas. Es inevitable concluir y aceptar que la inmunohistoquímica no funcionó para este estudio, no obstante que se practicó dos veces. Suponemos que las razones técnicas que propiciaron el fracaso fueron una o varias de las siguientes:

A) Los huesos estudiados se fijaron prolongadamente en formalina al 10% (3 días), lo cual como es sabido propicia la formación de enlaces cruzados en los filamentos intermedios que se van a estudiar, especialmente la citoqueratina, lo cual enmascara al antígeno buscado y provoca que la inmunotinción resulte aparentemente negativa. Para evitar este enmascaramiento del antígeno,

se pueden incubar los cortes en enzimas proteolíticas (como proteasa, tripsina, pepsina, etc), pero desgraciadamente las incubaciones prolongadas despegan los cortes de las laminillas, aún en cortes histológicos de tejidos no descalcificados. Este último señalamiento viene a propósito de que los cortes de este estudio son de hueso y por lo tanto fueron descalcificados, lo cual provoca que el tejido se desprege de la laminilla aún sin incubación en enzimas.

- B) Los huesos estudiados se descalcificaron en ácido fórmico y citrato de sodio también prolongadamente, un promedio de dos días, lo cual provoca una acidez en el tejido que es muy difícil de corregir aún con neutralización y con lavado enérgico en agua. Esta acidez puede influir definitivamente para que las reacciones antígeno-anticuerpo no se den en forma correcta, ya que después de todo esta unión es un fenómeno físico-químico.
- C) Fué una observación frecuente encontrar que las trabéculas óseas de los límites perimetrales de los septos de los sacos aéreos se encontraban completamente desnudas, o sea desprovistas del revestimiento de la delgada membrana que en condiciones normales las recubre. Solamente en forma focal se encontraron pequeñas porciones de membrana y de vasos en la pared, pero este hallazgo fue más frecuente en cortes con tinciones histoquímicas que con inmunotinciones. Se supone que al practicar los cortes histológicos, al incubar o al lavar en solución amortiguadora, fue posible que las membranas se desprendieran del hueso subyacente.
- D) No obstante que para filamentos intermedios la especificidad de los antígenos, y por supuesto de sus anticuerpos correspondientes, cruzan de unas especies a otras, en otras palabras que la vimentina de un martinete pescador o de un pavo es igual a la humana, en este estudio no se pudo confirmar esta regla. Esta aclaración se hace, teniendo en consideración que los anticuerpos

empleados para este estudio en general están preparados para uso en tejidos humanos. Porque de acuerdo a lo que hasta ahora se ha postulado, cuando menos las citoqueratinas y la vimentina pudieron haber resultado positivas: la citoqueratina en caso de que hubiera habido un revestimiento de tipo epitelial, y la vimentina simplemente por la presencia de tejido conectivo normal. Sin embargo, teniendo en consideración los resultados de los estudios de ultraestructura, la citoqueratina debió haber sido negativa y la vimentina positiva.

E) Para tratar de subsanar cualquiera de las deficiencias que pudieran haber sido atribuibles a la técnica inmunohistoquímica propiamente dicha, se repitieron los estudios dos veces.

El hecho definitivo es que los estudios inmunohistoquímicos resultaron totalmente negativos dos veces. Se considera que una o, preferiblemente, varias de las razones antes enunciadas fueron responsables de estos resultados inesperados. Por consiguiente, para las conclusiones que antes se mencionaron, solamente los resultados de los estudios ultraestructurales pueden ser tomados como parámetros confiables.

Durante mucho tiempo, en la era previa a la microscopía electrónica y a la inmunohistoquímica, se consideró que las membranas sinoviales tanto humanas como animales estaban constituidas por células epiteliales y fibroblásticas. Prácticamente había un acuerdo universal sobre la composición histológica de las membranas sinoviales. A tal grado de convencimiento se llegó, que a las células que revisten a las membranas sinoviales se les llamó sinoviocitos y se les comparó con las células mesoteliales que, aunque de origen mesenquimatoso, también se les consideraba de naturaleza epitelial. Además, el mismo grado de convencimiento de que las sinoviales eran de naturaleza epitelial propició que a los sarcomas sinoviales bifásicos, que

tienen en su composición células epiteliales y mesenquimatosas, se les atribuyera un origen en las membranas sinoviales. Sin embargo, los estudios ultraestructurales e inmunohistoquímicos demostraron que la membrana sinovial tiene en su composición dos tipos de células: las de tipo A que son indistinguibles de los histiocitos, y las de tipo B que son exactamente iguales a los fibroblastos. Además, dado el parecido que existe entre las membranas sinoviales y las membranas que revisten a las bursas eutópicas y heterotópicas, se demostró que también las bursas están tapizadas por células A y B. Actualmente, todos aquellos especialistas que manejan membranas sinoviales en su rutina de trabajo (como son ortopedistas, reumatólogos, internistas y patólogos) aceptan ya como un hecho indiscutible, que las membranas sinoviales carecen de células epiteliales y que son de naturaleza histiocítica-fibroblástica. Por consiguiente, no debe sorprender a nadie que hasta la actualidad numerosos estudiosos de la morfología de las aves sostengan que los sacos aéreos óseos están tapizados por un revestimiento epitelial, de la misma manera que durante mucho tiempo los estudiosos de las articulaciones estuvieron convencidos de que la membrana sinovial tenía un revestimiento epitelial. No es posible concluir, con el limitado número de casos que fueron utilizados para este estudio que carecen de revestimiento epitelial todos los sacos aéreos óseos de todas las especies aviarias, o que la composición histológica de todos los sacos aéreos óseos aviarios sea siempre la misma (histiocítica-fibroblástica). Para poder hacer un planteamiento formal se necesitaría de un estudio mucho más amplio, que incluyera un significativo número de especies aviarias y animales de diferentes edades.

Desde que Jaffe y Lichtenstein (16) describieron en 1942 las características del quiste óseo unicameral, quedaron establecidos varios hechos: a) que es más frecuente en niños; b) que hasta en el 75% de los casos afecta la metáfisis proximal del húmero (Figs. 16 y 17); c) que conforme transcurre el tiempo puede migrar distalmente hacia la diáfisis humeral (Fig. 16); d) que sí se fractura puede involucionar

espontáneamente (Fig. 17); e) que su cámara única puede contener un líquido seroso en su interior (Figs. 18 y 19); f) que para tratarlo basta remover con una legra la membrana que reviste su pared y rellenarlo de viruta ósea; g) que el legrado terapéutico siempre proporciona muy escasa cantidad de tejido; h) que el tejido muestra en la cara luminal unas células superficiales ocasionalmente epitelioides o endotelioides (Figs. 20 y 21); i) que el tejido muestra en la porción profunda fibroblastos y fibras colágenas hialinizadas (Figs. 22 y 23); j) que solamente en casos de fractura se deposita en la pared osteoide reactivo o hueso reparativo. Posteriormente, cuando esta lesión (que no es un verdadero tumor) se aceptó como una entidad de la patología ósea, se comenzó a especular sobre su posible histogénesis y/o patogenia. Se propuso que podía deberse a trauma, hemorragia local en la zona de crecimiento del hueso, infección, un desorden local en el desarrollo del crecimiento del hueso o a un origen en tejido sinovial. No es de sorprender, teniendo en cuenta lo anterior, que Mirra y cols (27) hayan concluido que el quiste óseo unicameral podía tener su origen en tejido sinovial ectópico. Sin embargo, han transcurrido sesenta años desde la caracterización del quiste óseo unicameral y todavía no se ha dado una explicación universalmente aceptada a su histogénesis y/o patogenia.

En 1991 Contreras (17) preparó una tesis recepcional en Anatomía Patológica, en la cual realizó un estudio histoquímico, inmunohistoquímico y ultraestructural del quiste óseo unicameral humano. Los principales resultados del estudio fueron: a) los quistes óseos unicamerales presentan una composición histológica constante; b) los quistes óseos unicamerales carecen de revestimiento epitelial o endotelial; c) la membrana que reviste a los quistes óseos unicamerales está compuesta por células histiocíticas y fibroblásticas (Figs. 20,21,22 y 23); d) inmunohistoquímicamente, las células histiocíticas fueron identificadas porque dieron positivas las reacciones para lisozima y para α 1-antiquimotripsina (Fig. 24), y las células fibroblásticas por presentar vimentina (Fig. 25); e) ultraestructuralmente, las células histiocíticas fueron

identificadas por sus lisosomas citoplasmáticos, y las células fibroblásticas por su riqueza en filamentos intermedios citoplasmáticos (Figs. 26 y 27); f) se identificó un tercer tipo de células que no pudieron ser clasificadas, y que ahora se piensa que pudieran ser células precursoras de, o intermedias entre, fibroblastos e histiocitos. Por los resultados del estudio se concluyó que el quiste óseo unicameral no era de origen epitelial o endotelial (vascular o linfático), y que la estructura de la membrana que los reviste es semejante a la de las membranas sinoviales y a la de las bursas. El estudio permitió eliminar a restos epiteliales, como los que se han propuesto para el origen de los adamantinomas de los huesos largos, a endotelios vasculares y probablemente a membranas sinoviales (pues nunca se han encontrado membranas sinoviales intraóseas), como los tejidos de origen del quiste óseo unicameral.

Del conocimiento profundo y actual del quiste óseo unicameral humano surgen una serie de preguntas interesantes sobre su histogénesis y/o patogenia. a) ¿porqué se presenta siempre en niños? y no a cualquier edad; b) ¿porqué se desarrolla prácticamente siempre en el mismo hueso?, en el húmero; c) ¿porqué se desarrolla prácticamente siempre en la misma región del hueso?, la metáfisis; d) ¿porqué migra durante el crecimiento del paciente de la metáfisis a la diáfisis?, siendo que otras lesiones óseas no migran; e) ¿porqué involuciona en forma espontánea o inducida?, sobre todo después de fracturas o por la inyección intralesional de esteroides o esclerosantes; f) ¿porqué se llena de líquido seroso?, ¿solamente porque el organismo no permite espacios vacíos?; g) ¿porqué tiene siempre una estructura morfológica tan simple y tan constante?; h) ¿porqué tiene un parecido morfológico a las membranas sinoviales y a las bursas?; e i) derivado de los resultados de este estudio se podría y se debe preguntar, ¿porqué tiene: en la edad en que se presenta, en el sitio en donde se desarrolla, en su desplazamiento o movilización dentro del hueso de origen, en su involución espontánea o inducida, y en su estructura histológica, ...un parecido a los sacos aéreos óseos de las aves?. La respuesta

científica puede ser muy simple, aunque no necesariamente cierta y/o suficientemente apoyada : porque ambas estructuras, una normal (los sacos aéreos óseos de las aves) y otra patológica (los quistes óseos unicamerales), pueden haber sido inducidas en su formación por la misma expresión del genoma; una que se dá en forma normal y natural en las aves, y la otra que ocurre por una desrepresión patológica del genoma humano (que probablemente se comparte con las aves) de origen desconocido.

Tradicionalmente, se pensó que las neoplasias se originaban necesariamente en tejidos provenientes de restos embrionarios. Como ejemplo existe el progonoma melanótico (de *progonoi* = ancestro) (28), que anteriormente fue conocido como tumor del primordio o anlage retineano, y que actualmente se considera como un tumor neuroectodérmico pigmentado de la infancia. Este tumor por supuesto que no se origina en el primordio retiniano y se ha descrito originándose en los huesos largos, epididimo, mediastino y tejidos blandos de las extremidades (29). Poco tiempo después, se creyó que para que se originara un tumor tenían que haber células o tejidos de la misma naturaleza que el tumor al que daban origen. Por ejemplo, rabiomioblastos para dar lugar a un rabiomiosarcoma. Sin embargo, se originan rabiomiosarcomas en sitios normalmente desprovistos de rabiomioblastos, como en los antros maxilares, las vías biliares, riñones, etc. Actualmente, se propone que muchas neoplasias no se originan en células diferenciadas o adultas, sino que se originan en células primitivas, células madre, células tronco, células basales, etc, cuya característica principal es su aparente indiferenciación y su capacidad multipotencial de diferenciación. Estas células son tan primitivas, que hasta ahora no se les puede identificar plenamente antes de que den origen a una neoplasia. La excepción a esta regla serían las células epiteliales, donde los cambios displásicos (leves a graves) son muy conocidos y están bien caracterizados.

Por otro lado, es frecuente que exista confusión conceptual de lo que representan las verdaderas neoplasias, los pseudotumores y algunas malformaciones congénitas que simulan tumores. Este es precisamente el caso del quiste óseo unicameral humano, el cual al considerarlo como un tumor verdadero se le puede buscar una histogénesis (tejido de origen), como en el tejido sinovial; al considerarlo como un pseudotumor se le puede atribuir una etiología inflamatoria o hemorrágica; o al considerarlo como una "malformación congénita debida a un desorden local del crecimiento del hueso" (cualquier cosa que esto signifique), simplemente se le encasilla junto con las demás malformaciones congénitas. Los resultados de este estudio, que a priori descartó las teorías neoplásica e inflamatoria, en realidad sí apoyan que el quiste óseo unicameral pueda representar una irregularidad del crecimiento o desarrollo, lo cual permitiría agruparla con el resto de las malformaciones congénitas. Es probable que cuando se conozca más sobre los genes que controlan el desarrollo, se pueda agrupar al quiste óseo unicameral humano con los síndromes dismórficos de la dismorfología (vágase la redundancia), considerando que "una malformación es un defecto morfológico que resulta de un proceso de desarrollo intrínsecamente anormal" (30). Sobre estas bases, la propuesta original de este estudio, consiste en relacionar etiopatogénicamente una estructura normal de los huesos de las aves con una lesión quística de los humanos, demostrando que ambas estructuras tienen una misma composición histológica, aún a nivel ultraestructural. Además, los resultados de este estudio también cuestionan muy seriamente que los sacos aéreos óseos de las aves cuenten con un revestimiento epitelial, el cual hasta ahora se venía señalando como indudablemente existente.

Finalmente, de la misma manera que casi seguramente se retuvo un gen homólogo de los genes del CMH de clase I aviar y que posteriormente dio origen al CD1 de los mamíferos, no obstante que generalmente no se conservan los genes no clásicos de clase I de origen aviar en las diferentes especies de mamíferos (6,7), es posible que el gen (o los genes) que

condiciona(n) la formación de los sacos aéreos óseos de las aves, que probablemente no se expresa(n) o está(n) reprimido(s) en el hombre, se manifieste(n) y de(n) lugar al quiste óseo unicameral humano. Sin embargo, se requeriría de practicar estudios tan completos y elegantes como los que llevaron a cabo Hughes y Nei (6) y Hughes (7), para demostrar con genética molecular la relación evolutiva que existe entre el CMH aviar y el CD1 de los mamíferos, para poder sustentar sobre bases comparables la probable relación existente entre los sacos aéreos óseos y el quiste óseo unicameral. Baste por ahora afirmar, que ambas estructuras (una normal y la otra patológica, una aviaria y la otra humana, respectivamente) tienen la misma composición histológica, y que comparten características de su desarrollo y clínicas que las hacen parecerse mucho. Por lo tanto, no parece temerario afirmar que el quiste óseo unicameral de los humanos podría representar un vestigio atávico (o un atavismo filogenético) de los sacos aéreos óseos de las aves, y que, con los estudios practicados y las especies aviarias estudiadas, parece ser que los sacos aéreos óseos carecen de un revestimiento epitelial o endotelial.

Permítase terminar esta tesis con las sabias palabras de Maurer (31): “Un hombre, no es únicamente hijo de sus padres. Más bien es el producto final de una inconmensurable línea de ancestros, como atestiguan los simples pasos de su evolución embrionaria y los numerosos vestigios que se encuentran presentes en su forma terminada. Tales testimonios muestran que los genes del huevo impregnado, contienen los factores hereditarios de muchos diferentes tipos de animales” (¡Y esto fue escrito en 1929!) A las consideraciones de Maurer (31), avaladas por Laidlaw y Murray (22), habría que agregar: que esos factores hereditarios originales (cualquiera que ésa su origen y/o su composición) pueden ser importantemente alterados o modificados por mutaciones, los primeros días de la gestación, por factores extrínsecos de naturaleza viral, química o física. Lo cual puede conducir a que el 50% de los abortos humanos tengan una alteración genética incompatible con la vida, y a

que el 8% de los niños que alcanzan los 5 años de edad desarrollen una malformación estructural mayor (30). Y sí los nevos intradérmicos humanos en realidad representan vestigios filogenéticos de las manchas táctiles de los reptiles y de los anfibios, como lo proponen Laidlaw y Murray (22,24), entonces el 100% de los humanos somos portadores de una malformación estructural menor.

CONCLUSIONES

- 1.- Los húmeros de las gallinas, pavos adultos y martinetes pescadores presentaron húmeros neummatizados, con ciertas excepciones.
- 2.- Los húmeros de 6 pavitos no presentaron proceso de neummatización detectable a las 4 semanas de edad.
- 3.- Las especies aviares estudiadas y las edades de los animales seleccionados no fueron adecuadas para estudiar las etapas del proceso de neummatización.
- 4.- Los huesos neummatizados presentaron cámaras aéreas tapizadas por una delgada membrana, que a veces se perdió durante el procesamiento técnico al que se sometió el hueso.
- 5.- Los estudios de histoquímica no contribuyeron a conocer la verdadera naturaleza de la membrana de los sacos aéreos.
- 6.- Los estudios de inmunohistoquímica dieron resultados negativos, probablemente por razones técnicas, y no contribuyeron a conocer la verdadera naturaleza de la membrana de los sacos aéreos óseos.
- 7.- Los estudios de ultraestructura definitivamente esclarecieron la verdadera naturaleza de la membrana de los sacos aéreos.
- 8.- La ultraestructura demostró que la membrana no es de naturaleza epitelial y mesenquimatosa, como actualmente se considera, sino que es de naturaleza histiocítica y fibroblástica.
- 9.- Los histiocitos estuvieron marcados por múltiples lisosomas y los fibroblastos por retículo endoplásmico rugoso.

10.- No se encontró ningún indicio de revestimiento epitelial, endotelial o mesotelial en la membrana de los sacos aéreos óseos.

11.- La revisión de los estudios histoquímicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales de 6 quistes óseos unicamerales humanos, demostró que éstos presentan la misma estructura histológica que los sacos aéreos óseos de las aves.

12.- Se encontró que la estructura histológica de los sacos aéreos óseos de las aves también es semejante a la de las membranas sinoviales y a la de las bursas, estructuras donde también se había sospechado un revestimiento epitelial.

13.- Complementariamente, se propone la necesidad de practicar estudios formales multidisciplinarios de tipo genético en diferentes especies de aves y en animales de diferentes edades, para tratar de establecer objetivamente si los quistes óseos unicamerales son producto de un gen atávico y si existe una relación con los genes que dan lugar a los sacos aéreos óseos en las aves.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Gould SJ. La evolución como hecho y como teoría. En Dientes de Gallina y Dedos de Caballo. 2a ed. *Editorial Blume*, España. 1984; pp 271-280
- 2) Fontdevila A. El mantenimiento de la variabilidad genética de las poblaciones. En Dientes de Gallina y Dedos de Caballo. 2a ed. *Editorial Blume*, España. 1984; pp 91-104
- 3) Shapiro SG. Uniformity in the Nonsynonymous Substitution Rates of Embryonic β -Globin Genes of Several Vertebrate Species. *J Mol Evol* 1991; 32:122-127
- 4) Olea Franco A. La teoría del Equilibrio Puntuado. Una Alternativa al Neodarwinismo. *Ciencias*, 1986. pp 46-59
- 5) Adachi J, CaoY, Hasegawa M. Tempo and Mode of Mitochondrial DNA Evolution in Vertebrates at the Amino Acid Sequence Level: Rapid Evolution in Warm-Blooded Vertebrates. *J Mol Evol* 1993;36: 270-281
- 6) Hughes AL, Nei M. Evolutionary Relationships of Class II Major-Histocompatibility -Complex Genes in Mammals. *Mol Biol Evol* 1990;7:491-514
- 7) Hughes AL. Evolutionary Origin and Diversification of the Mammalian CD1 Antigen Genes. *Mol Biol Evol* 1991; 8:185-201
- 8) Wang H, Parent M, Morais R. Cloning and characterization of a cDNA encoding elongation factor 1 α from chicken cells devoid of mitochondrial DNA. *Gene* 1994;140:151-161
- 9) Mitchell JR. The number and location of air sacs in broiler chickens and the implication in *Escherichia coli* infection. *J Sou Afr Vet Ass* 1984; 55:57-60

- 10) Aranda Merlo ME. Mecanismo de neumatización del hueso húmero en la gallina doméstica. Tesis de Licenciatura, *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1990*
- 11) Riddel C, Helmboldt CF, Singsen EP. A histologic study of medullary bone of laying hens under different diet and housing conditions. *Avian Dis* 1969;13:163-170
- 12) Hogg DA . The distribution of pneumatization in the skeleton of the adult domestic fowl. *J Anat* 1984; 138: 617-629
- 13) Hogg DA . The development of pneumatization in the skull of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *J Anat* 1990;169: 139-151
- 14) Riddel C, Helmboldt CF, Singsen EP. Matterson LD. Bone pathology of birds affected with cage layer fatigue. *Avian Dis* 1968;12:285-297
- 15) Howlett CR . The fine structure of the proximal growth plate and metaphysis of the avian tibia:endochondral osteogenesis. *J Anat* 1980; 130:745-768
- 16) Jaffe H, Lichtenstein L. Solitary unicameral bone cyst with emphasis on the roentgen picture, the pathologic appearance, and the pathogenesis. *Arch Surg* 1942; 44:1004-1025
- 17) Contreras-M. ¿Existe algún tipo de revestimiento en el quiste óseo unicameral? Tesis de Posgrado para obtener la especialidad en Anatomía Patológica. México D.F. México. *Facultad de Medicina, UNAM. 1993.*
- 18) Smith, R, Smith. Solitary unicameral bone cyst of the calcaneus. A review of twenty cases. *J Bone Joint Surg* 1974;56: 49-56

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 19) Campanacci M. Unicameral and aneurysmal bone cysts. *Clin Orthop* 1986;204:25-36
- 20) Edwards J, Sedwick D. Formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air. *J Pathol* 1981; 134:147-156
- 21) Luna L. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. *Mc. Graw Hill, New York, 1968.*
- 22) Laidlaw GF, Murray MR. Melanoma Studies. III. A theory of pigmented moles. Their relation to the evolution of hair follicles. *Am J Path* 1933; 9: 827-838
- 23) Kardong KV. Vertebrados. Anatomía comparada, función y evolución. 2ª edición. *Mc Graw Hill. 1999, pp 380-384*
- 24) Laidlaw GF, Murray MR. A theory of pigmented moles. Their relation to the evolution of hair follicles. *Am J Path* 1933;9:947-948
- 25) Perrone T, Sibley RK, Rosai J. Duodenal gangliocytic paraganglioma. An immunohistochemical and ultrastructural study and a hypothesis concerning its origin. *Am J Surg Pathol* 1985; 9:31-41
- 26) Miyake J, Ireland K. Ovarian mature teratoma with homunculus coexisting with an intrauterine pregnancy. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:1192-1194
- 27) Mirra J, Bernard GW, Bullough PG, Mink G. Cementum-like bone production in solitary bone cysts (so called "cementoma" of long bones). Report of three cases. Electron microscopic observations supporting a synovial origin to the simple bone cyst. *Clin Orthop* 1978; 135: 295-307

- 28) Borello ED, Gorlin RJ. Melanotic neuroectodermal tumor of infancy. A neoplasm of neural crest origin. *Cancer* 1966;19:196-206
- 29) Rosai J. Mandible and Maxilla. En Ackerman's Surgical Pathology. Ed J Rosai, 8th ed, *The C.V. Mosby Co. ST Louis, Toronto, Washington DC, 1989*, pp 220-221
- 30) Thompson MW, Mc Innes RR, Willard HF: Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 5th ed. *W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1991* pp 391-394
- 31) Maurer F. Der gegen wärtige Stand der Lehre von Darwinismus. *Deutsche Med Wchnschr* 1929; 55:1433-1435

CUADRO 1

RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE HISTOQUIMICA

ESPECIE *	Sacos aéreos	Con una cámara	Membrana limitante	Tejido conectivo	No. de capas
Pericos	Si 10/10	Si	Si	Si	Una
Gallinas	Si 7/8	Si	Si	Si	Varias
Pavitos	No	No			
Pavos	Si 1/2	Si	Si	Si	Ocho
Martinetes	Si 3/3	Si	Si	Si	Una

* Se utilizan los nombres vulgares de las especies aviarias estudiadas en obvio de espacio suficiente para tabulación

CUADRO 2

RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

ESPECIE *	No. de capas	Fibro- blastos	Colágena	Histioci- -tos	Células interme- -dias	Endo- telio	Epite- lio
Pericos	5	Si	Si	Si	Si	No	No
Gallinas	Varias	Si	Si	Si	No	No	No
Pavos	6 y 8	Si	Si	Si	No	No	No
Martinetes	Varias	Si		Si	Si	No	No

* Se utilizan los nombres vulgares de las especies aviarias estudiadas en obvio de espacio suficiente para tabulación

CUADRO 3

ANTICUERPOS PARA INMUNOHISTOQUÌMICA EN SACOS AEREOS OSEOS DE AVES

<u>Nombre del anticuerpo</u>	<u>Siglas</u>
Marcadores epiteliales:	
Citoqueratina Hospital General	CKHG
Citoqueratina de amplio espectro	KAE
Cocktail de citoqueratinas de bajo y alto Peso molecular	AE1-AE3
Antígeno de membrana epitelial	AME
Antígeno epitelial	AgE
Antígeno epitelial luminal	AgEL
Marcador para fibroblastos	
Vimentina	Vim
Marcadores para histiocitos	
Lisozima (muramidasa)	Lis
Alfa 1-antitripsina	α 1-AT
Alfa 1- antiquimotripsina	α 1- AQT
Marcadores para vasos y células endoteliales	
Colágena de tipo IV	Col IV
Ulex europeaus	Ulex
Antígeno relacionado con el factor VIII	FVIII



Fig 1: Placa AP de tórax de una gallina Leghorn, la cual muestra en la epífisis y metáfisis proximales de los húmeros sus respectivos sacos aéreos óseos; los sacos aéreos muestran asimetría porque en el lado izquierdo se inyectó medio de contraste baritado.

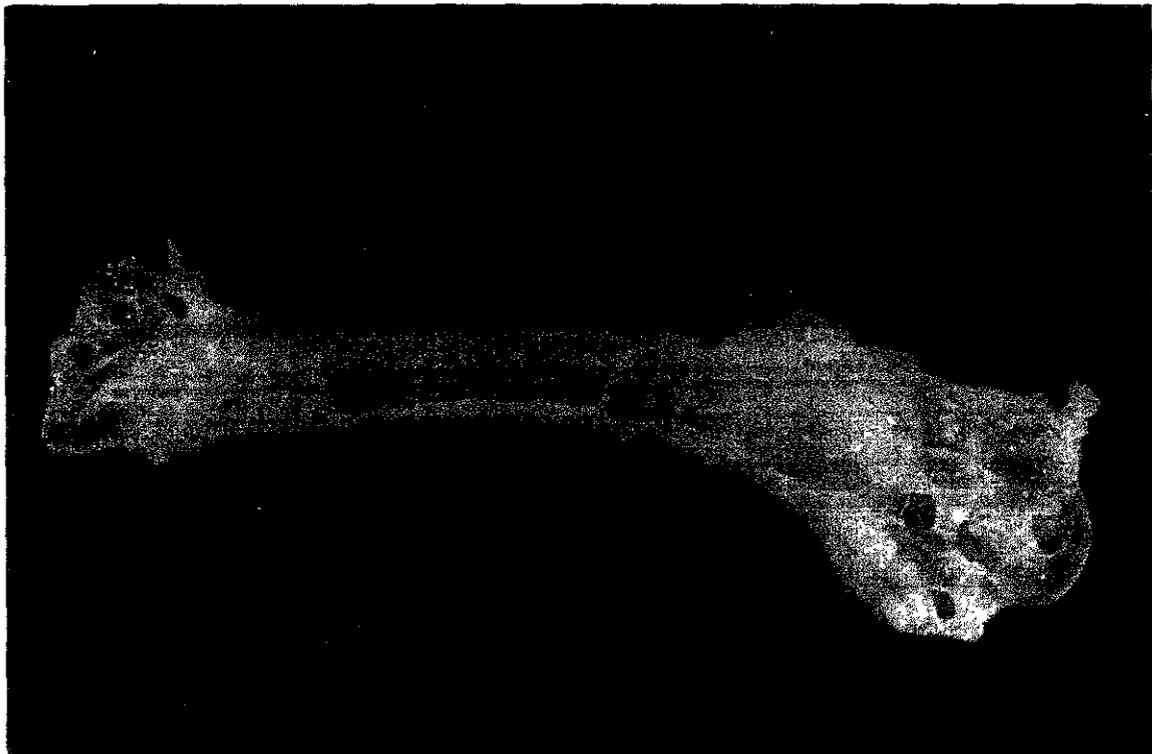


Fig 2: Corte longitudinal de un húmero de gallina Leghorn que muestra neumatización de prácticamente todo el hueso, la cual es multiloculada en los extremos y casi uniloculada en la diáfisis.

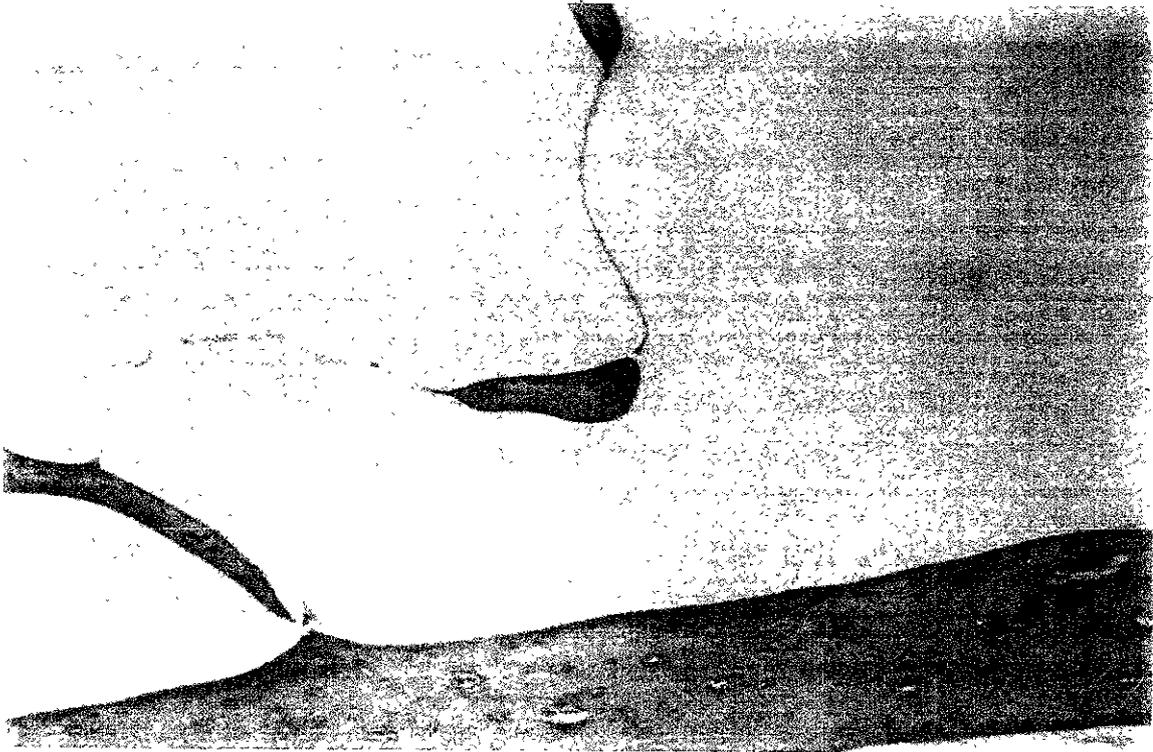


Fig 3 : Húmero neummatizado de martinete pescador que muestra una gran cámara tapizada por una delgada membrana que forma puentes entre las espículas óseas que se proyectan hacia la cavidad. H.E 40X.

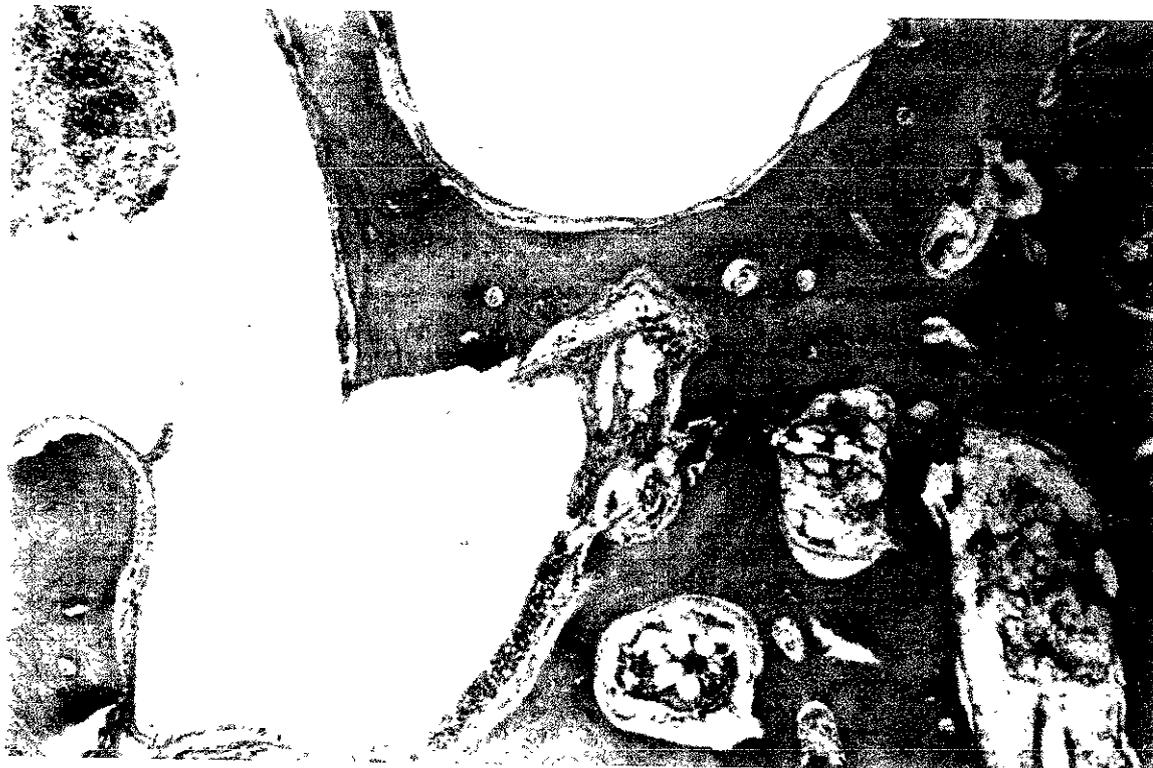


Fig 4 : Húmero neummatizado de pavo que aparenta estar formado por diferentes cámaras, aunque siempre se encuentra tapizado por una membrana compuesta por varias capas de células infiltradas por hemorragia. Tricrómica de Masson. 40X

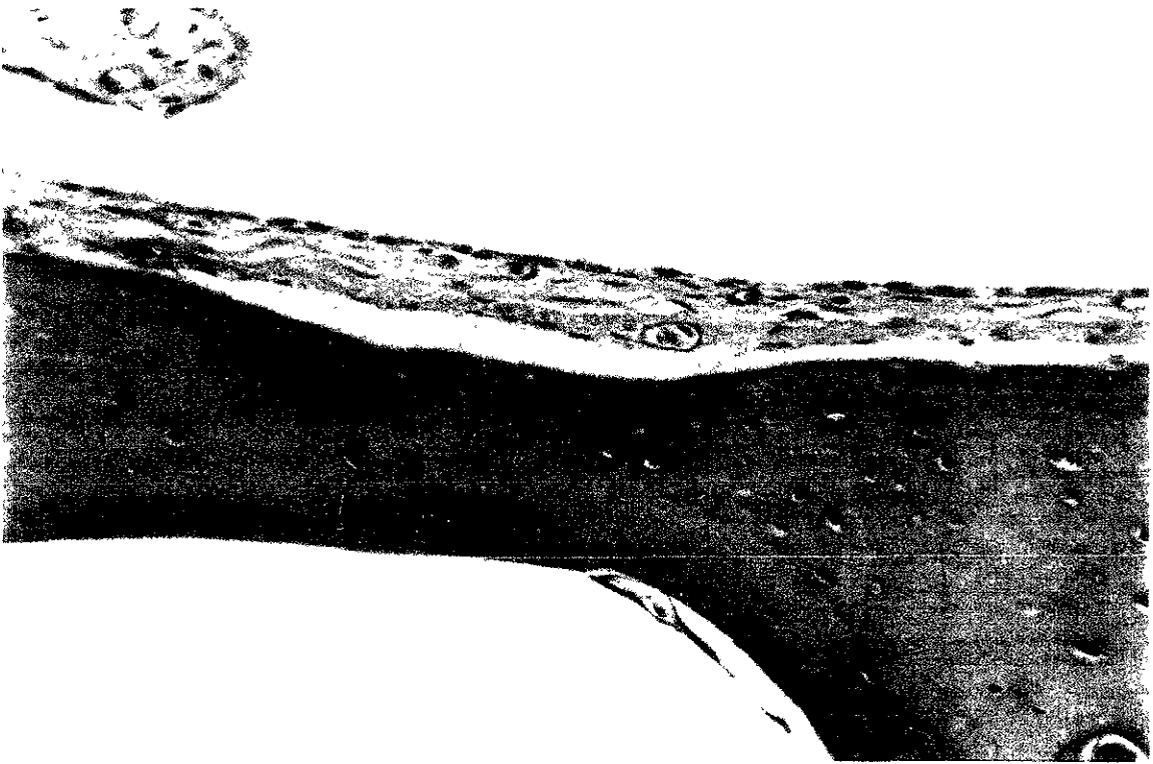


Fig 5: Pared de una cámara neumática tapizada por una sola capa de células que recuerdan endotelio o epitelio plano, asentadas sobre varias capas de tejido conectivo. Tricrómica de Masson.



Fig 6: Acercamiento de la figura 5, donde se aprecian mejor los detalles señalados.



Fig 7: Cámara neumática de pavo que permite ver que la membrana está formada por varias capas de células y fibras colágenas que alternan con vasos congestivos. Las células de la superficie recuerdan endotelio. Tricrómica de Masson.



Fig 8: Acercamiento de la pared de una cámara neumática de gallina, en la cual se puede ver que las células tienen citoplasmas granuloso y núcleos excéntricos, que pueden corresponder a histiocitos. Tricrómica de Masson



Fig 9: Vista panorámica del aspecto ultraestructural de la membrana que recubre al húmero neumatizado, donde las células superficiales son de tipo histiocítico (H), dotadas de filopodia (flecha) y vacuolas (V). Las células profundas presentan un citoplasma fibrilar y recuerdan a los fibroblastos (F). Las células intermedias (CI) se encuentran entre las dos capas anteriores. Barra=2.5 μ m

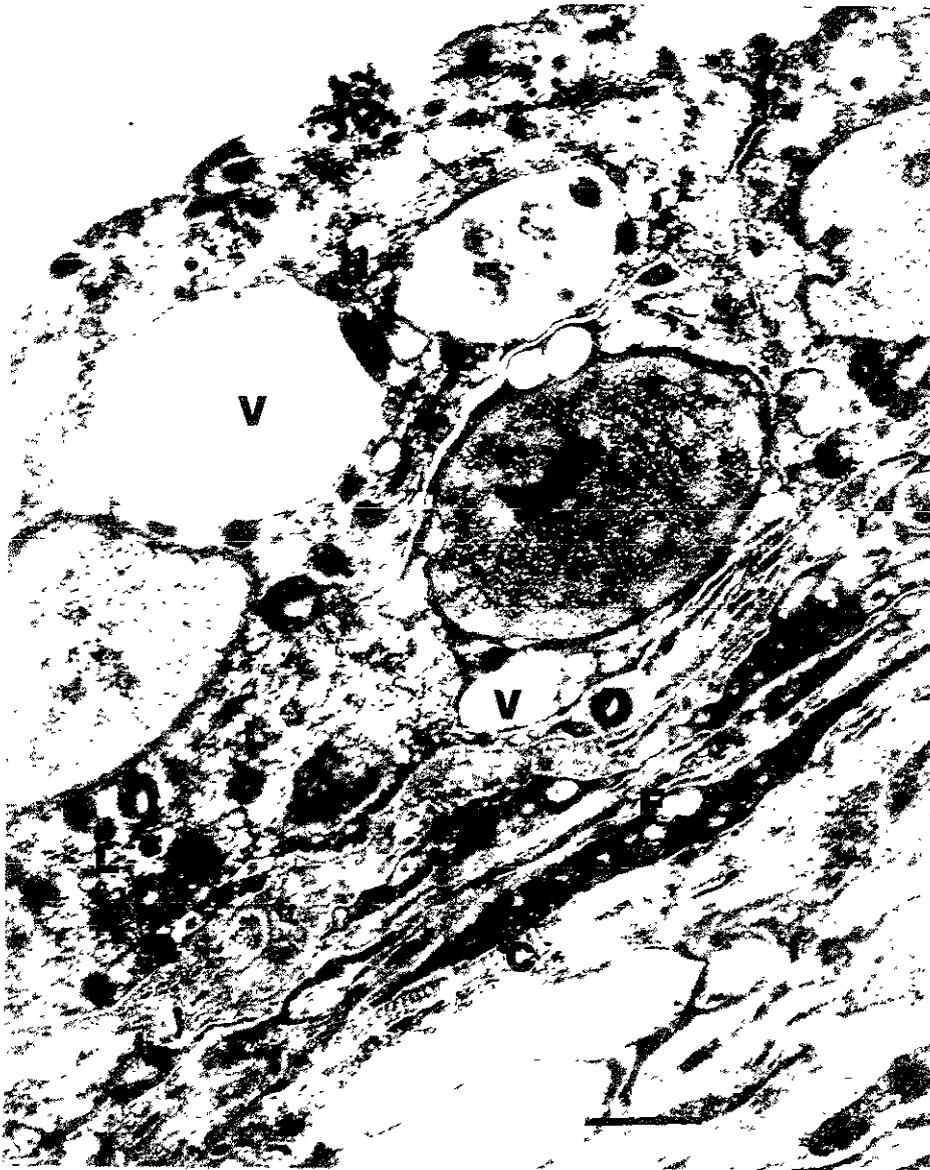


Fig 10 : Vista panorámica de la ultraestructura de la membrana que reviste al húmero neummatizado, donde las células superficiales son muy histiocíticas (H) y las células profundas son de aspecto fibroblástico (F). Numerosos lisosomas (L) y vacuolas (V) destacan en el citoplasma de las células histiocíticas. Barra=1.1µm



Fig 11: La porción profunda de la membrana que reviste a la cámara neumática del húmero está constituida por células francamente fibroblásticas (F) que están separadas por bandas de fibras colágenas (C). En la porción superior se observan células intermedias (CI), las cuales todavía recuerdan en su forma al fibroblasto y, sin embargo, poseen lisosomas (L) y vacuolas (V) en su citoplasma. Barra=1.1 μ m

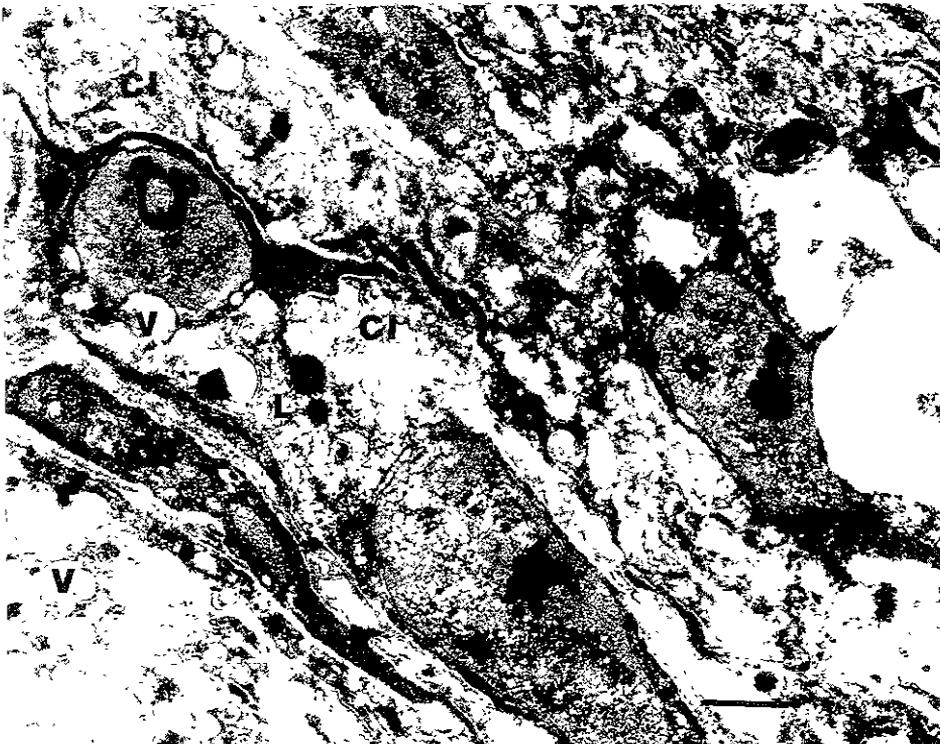


Fig 12 : Células intermedias (CI), caracterizadas por un citoplasma fibrilar que presenta lisosomas (L) y vacuolas (V), las cuales ocupan una posición intermedia entre las capas de fibroblastos e histiocitos. Barra=1.1 μ m

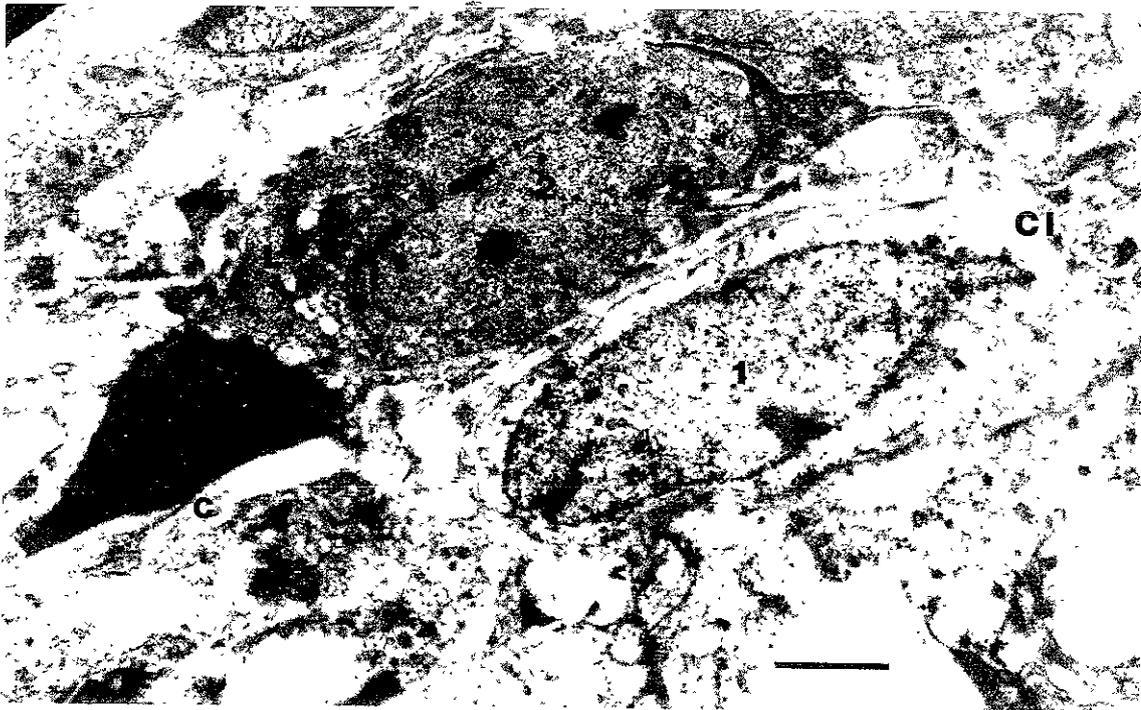


Fig 13 : Estas dos células intermedias (CI) muestran variación en su citoplasma. La célula profunda (1) presenta un mayor parecido a fibroblasto, mientras que la superficial (2) tiene un citoplasma con mayor diferenciación histiocítica, la cual incluye mayor electrodensidad del citoplasma y lisosomas (L). Haces de colágena (C) separan a las células. Barra=1.7 μ m

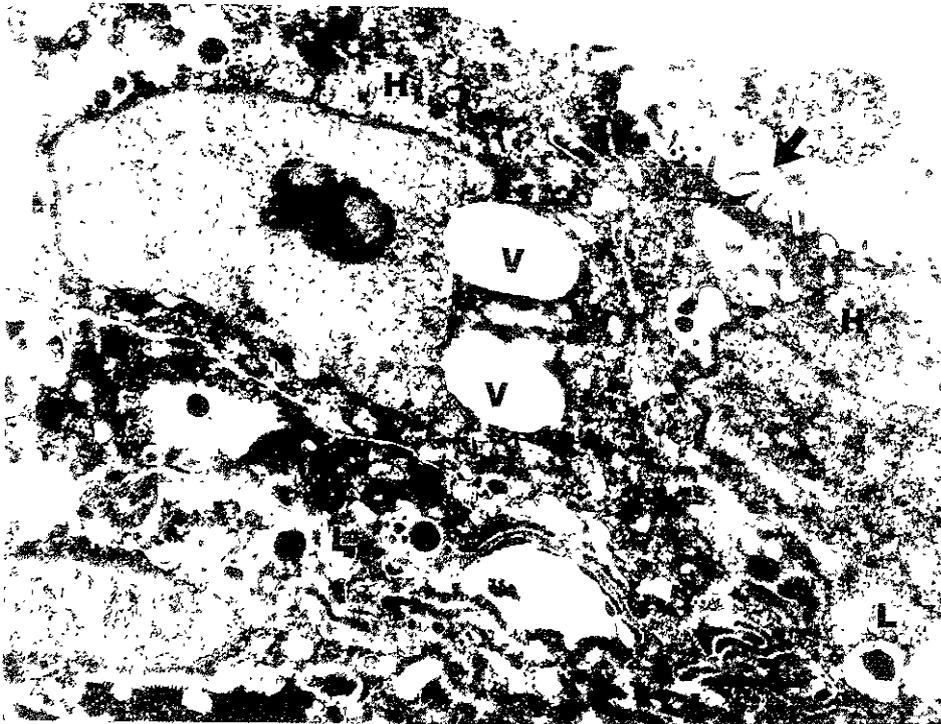


Fig 14: La porción superficial de la membrana que reviste al húmero neummatizado está constituida por células histiocíticas (H) dotadas de filopodia en la superficie (flecha) y de numerosos lisosomas (L) en sus citoplasmas. También existen numerosas vacuolas citoplasmáticas (V) , lo cual indica que tienen poco citoesqueleto. Barra= 1.1 μ m

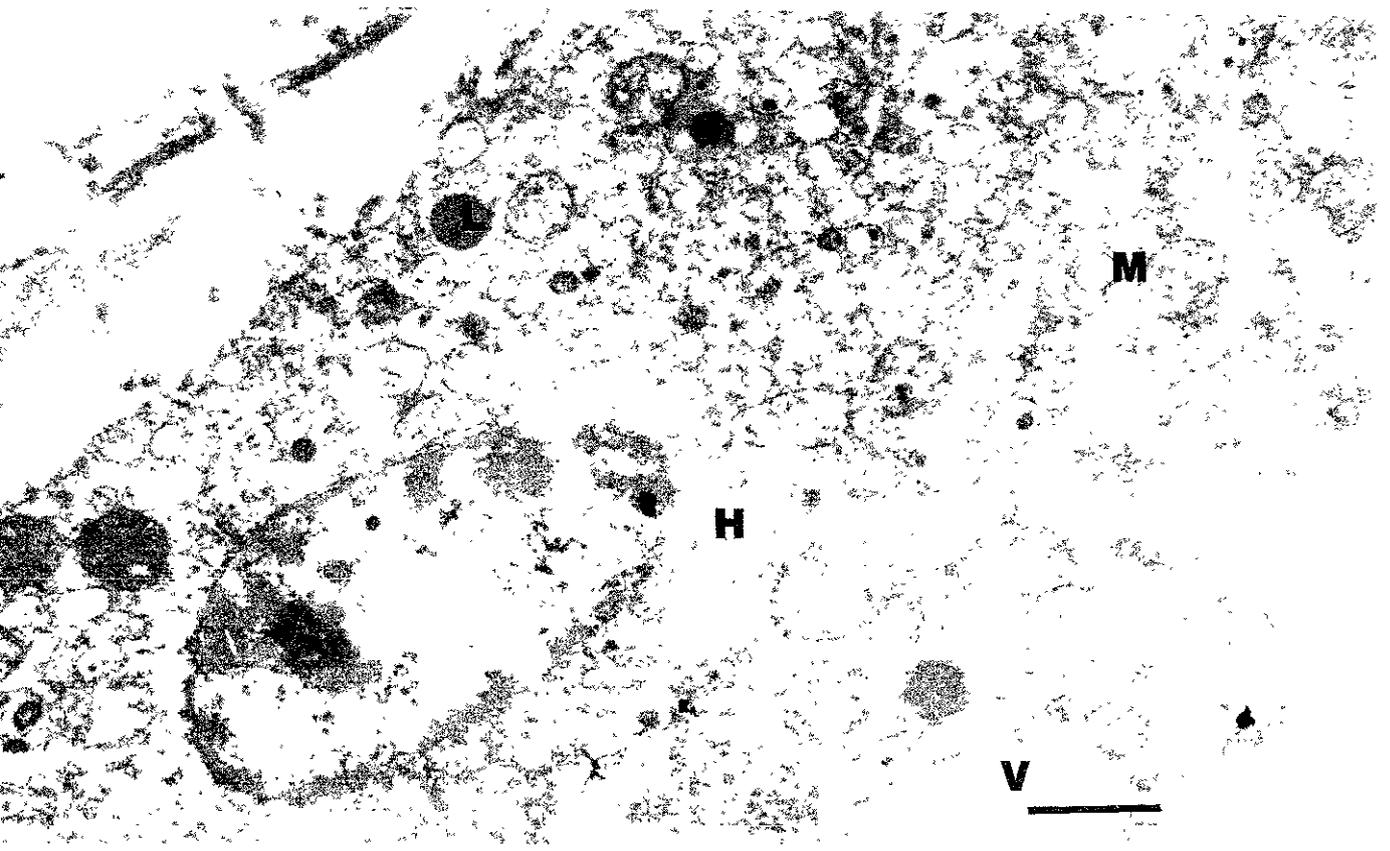


Fig 15: Célula francamente histiocítica (H) que presenta un abundante citoplasma ocupado por lisosomas (L), mitocondrias (M), y vacuolas (V). El aspecto del citoplasma totalmente ocupado por organelos es característico de los histiocitos. Barra= 1.1 μ m

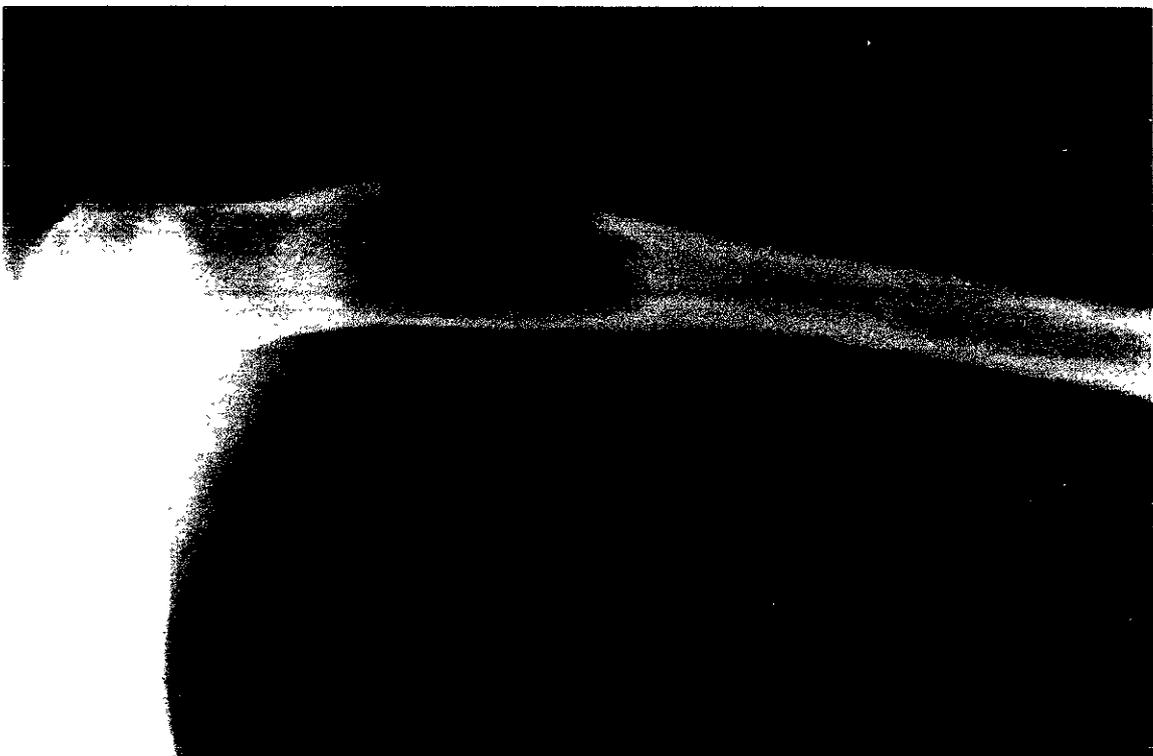


Fig 16: Placa simple de un quiste óseo unicameral del húmero de un niño de 12 años, que presenta una lesión metafisiaria y diafisiaria, probablemente por migración de la misma.

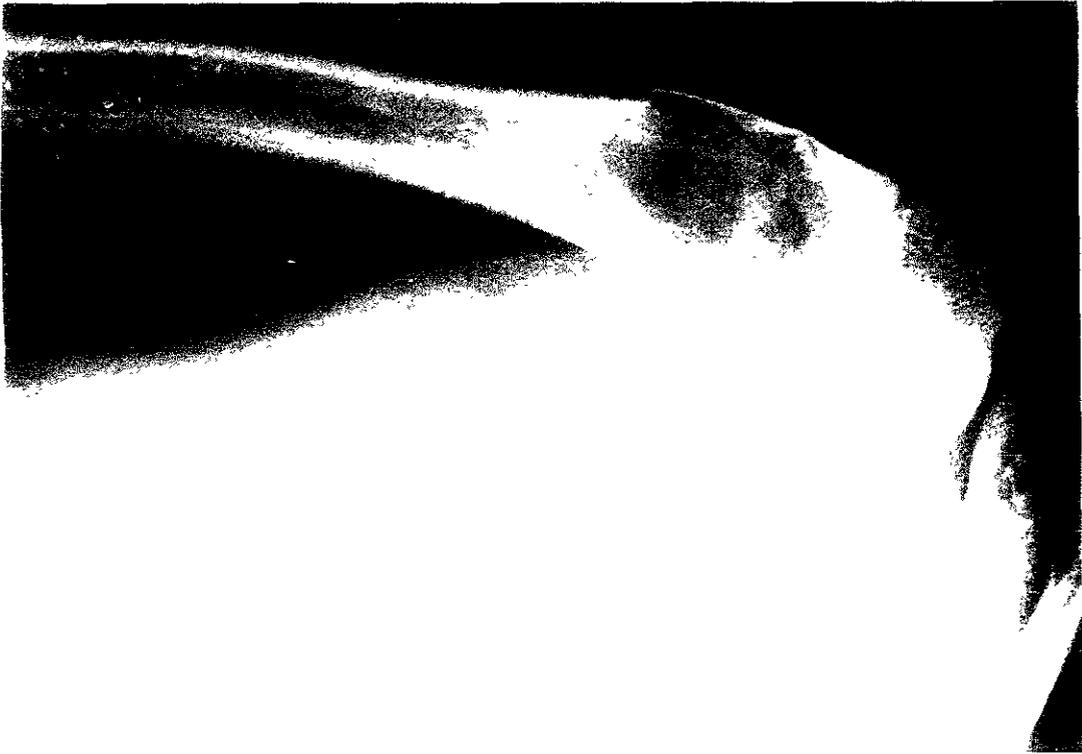


Fig 17: Placa simple de un quiste óseo unicameral del húmero de un niño de 15 años, la cual muestra una lesión en la metáfisis que ha sufrido fractura de la pared externa. No se ha iniciado todavía el cayo de fractura.



Fig 18: Aspecto macroscópico de un corte longitudinal de un quiste óseo unicameral que afectaba la metáfisis proximal del peroné. La cavidad es única y se encuentra tapizada por una delgada membrana que se adosa a la cara interna de las paredes óseas. El cartílago de crecimiento todavía está presente.

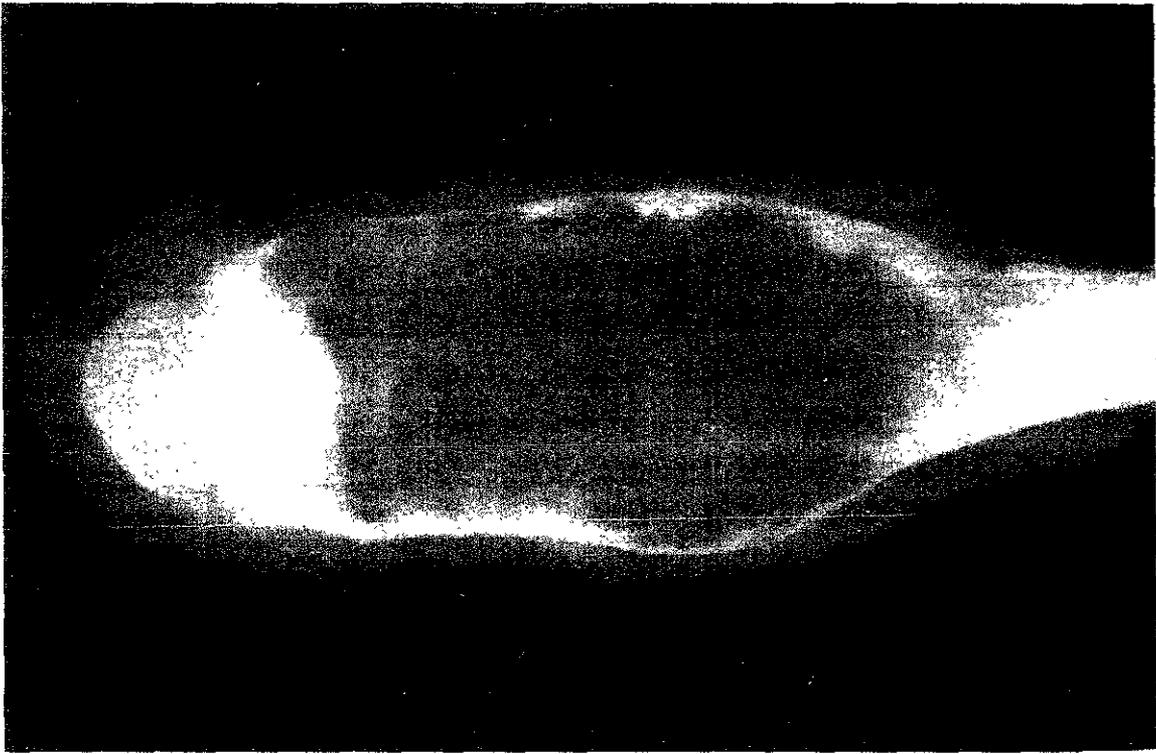


Fig 19: Placa simple de la pieza anatómica que se ilustra en la figura 18. La cámara única de la lesión y las paredes delgadas del quiste son muy aparentes.



Fig 20: Corte histológico de la membrana que reviste las paredes del quiste ócico unicameral, donde destaca una gruesa capa de tejido conjuntivo y una capa delgada de células que se localizan en la porción más superficial. H.E.

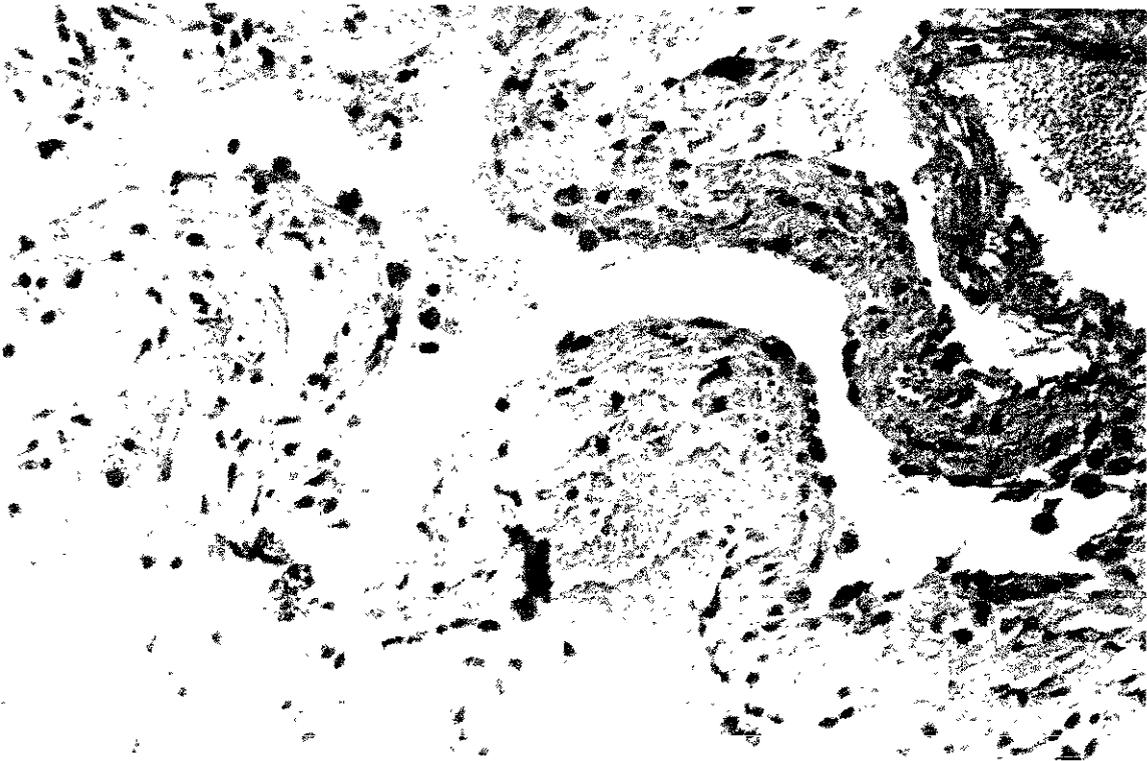


Fig 21: Acercamiento del aspecto histológico del quiste óseo unicameral que se ilustra en la figura 20, siendo más aparentes a este aumento las células superficiales que recuerdan un revestimiento endotelial o epitelial plano, así como el tejido conjuntivo que constituye el resto de la pared. H.E.

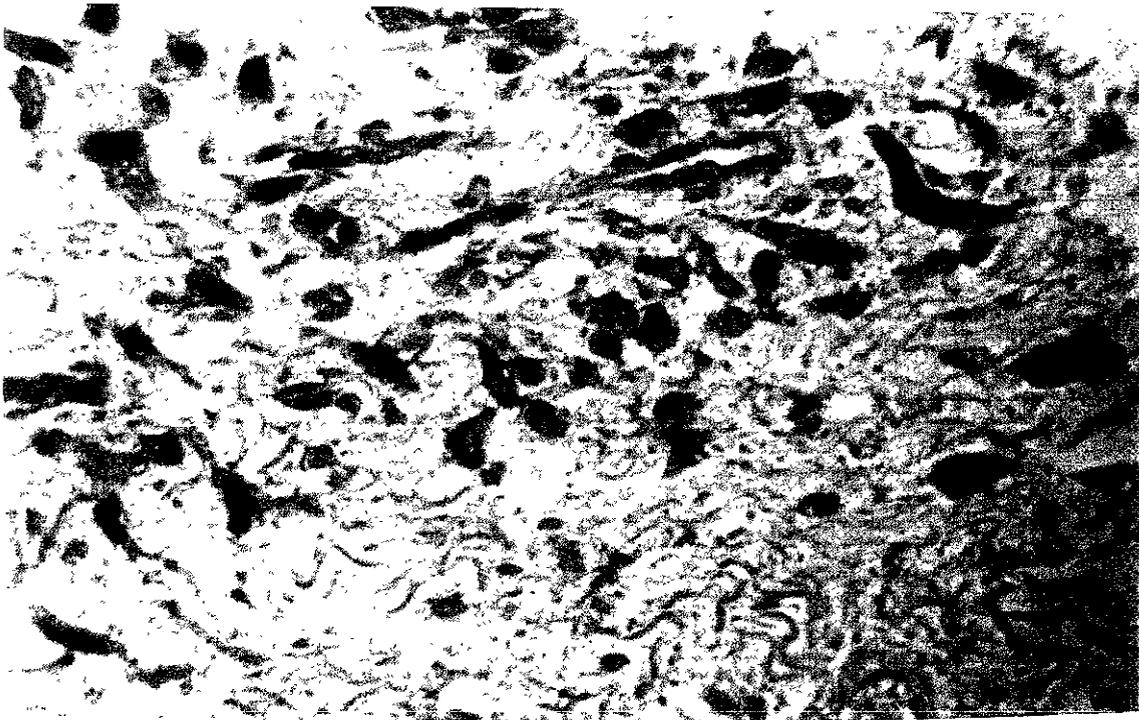


Fig 22: Porciones de la pared de un quiste óseo unicameral, donde las células superficiales son francamente histiocíticas, asentando sobre una colágena rizada pobre en fibroblastos. Tricrómica de Masson.

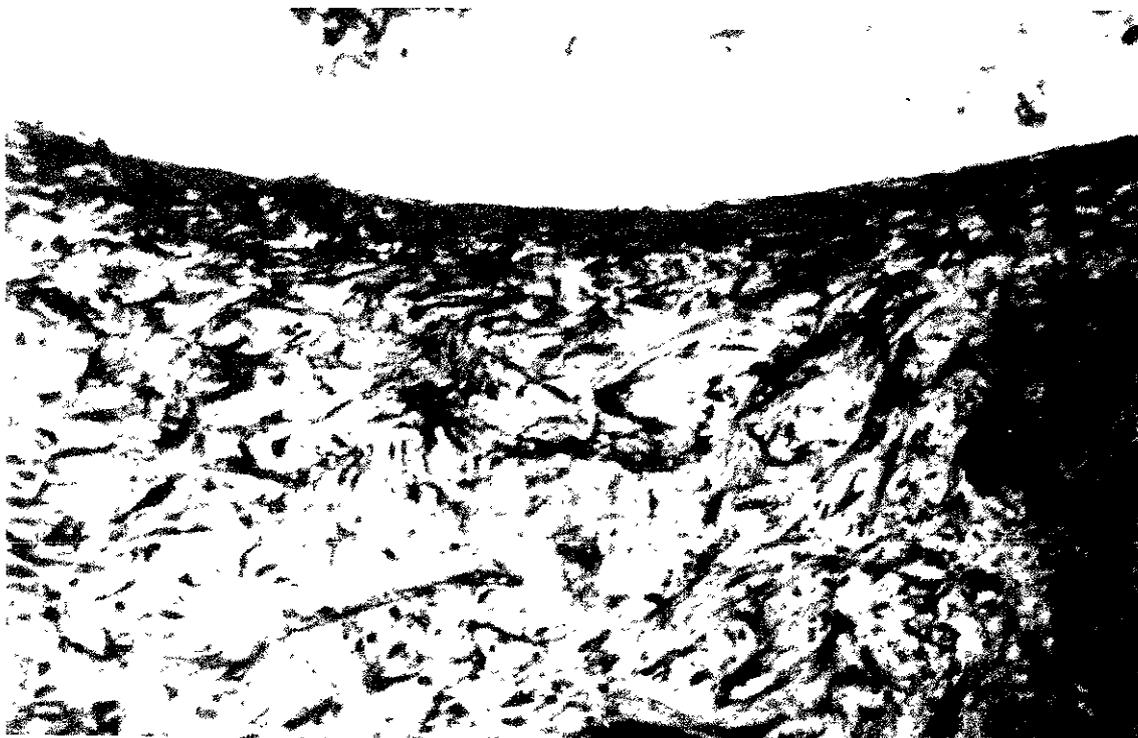


Fig 23: Vista semipanorámica de la pared de un quiste óseo unicameral, donde el componente profundo recuerda más a miofibroblastos que a fibroblastos. En la porción derecha se observa osteoide reactivo teñido en azul. Tricrómica de Masson.

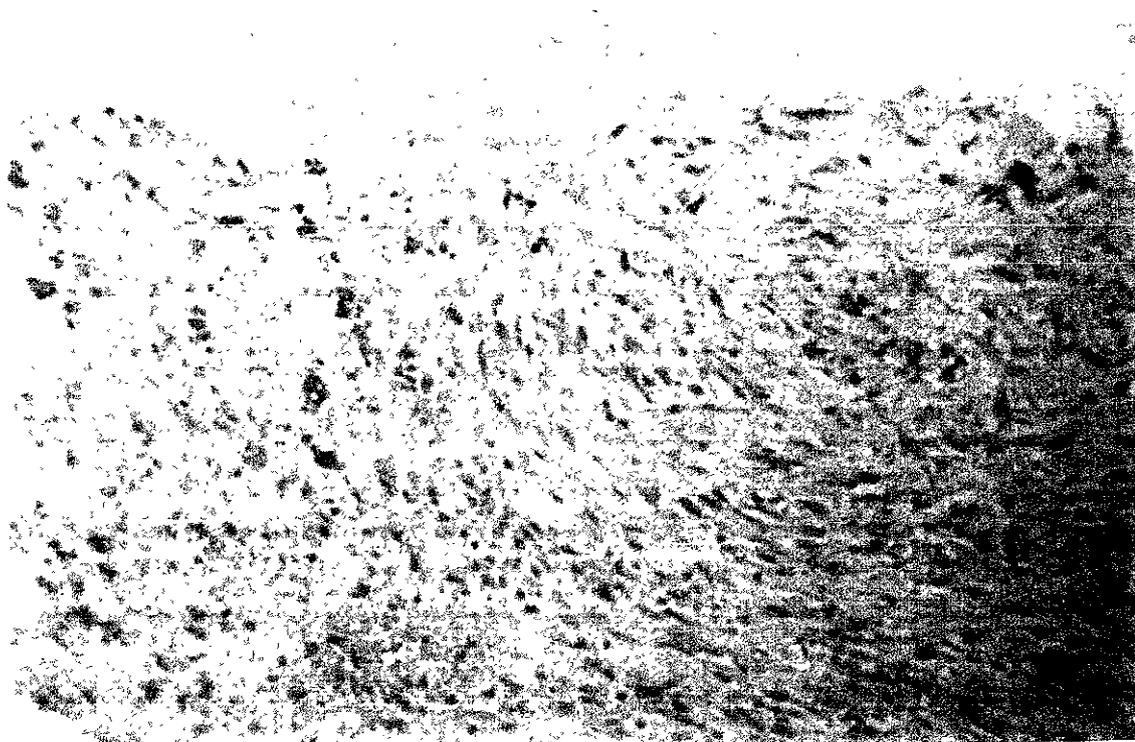


Fig 24: Porciones de la pared de un quiste óseo unicameral, donde destacan algunas células de aspecto histioide con sus citoplasmas vacuolados (flechas) y positivos para α IAQT. Revelado con DAB.

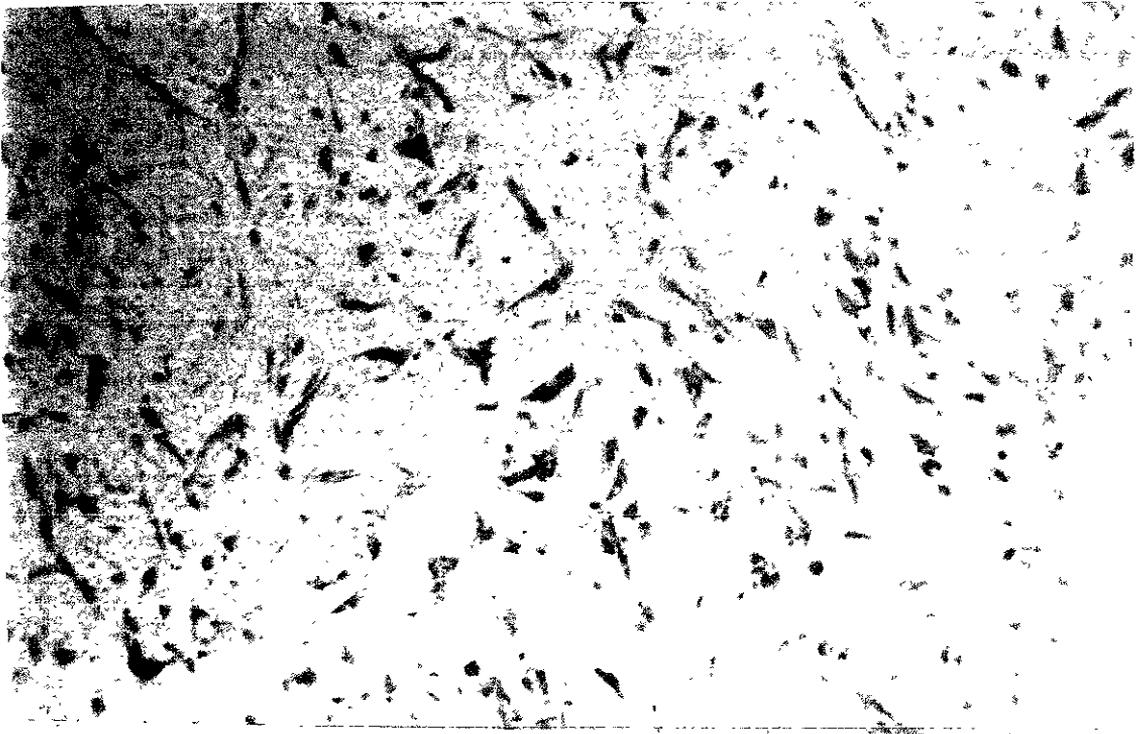


Fig 25: Células fibroblásticas y miofibroblásticas de la pared de un quiste óseo unicameral que han dado una intensa reacción positiva para vimentina. El endotelio vascular también es positivo. Revelado con DAB

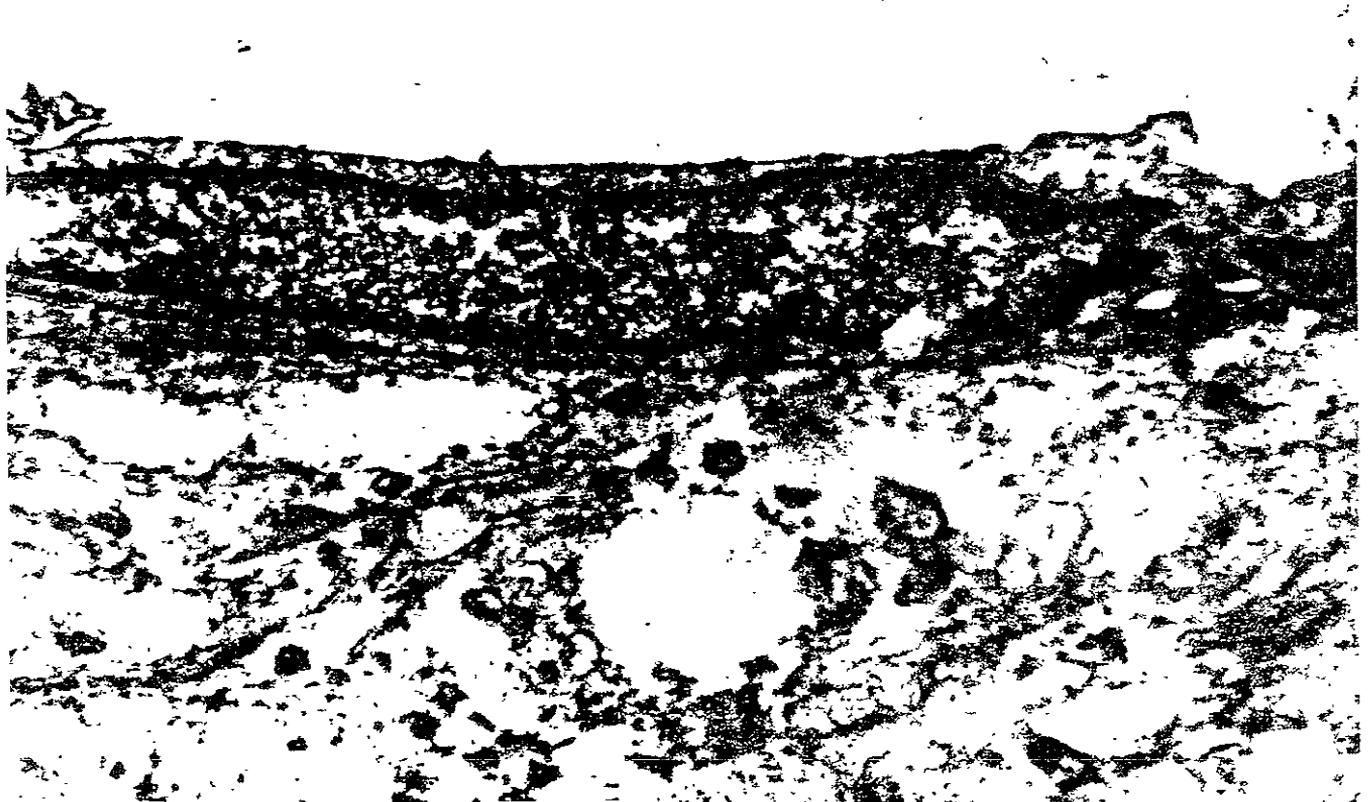


Fig 26: Electromicrografía de las células superficiales de la pared del quiste óseo unicameral, que recuerda a un tipo de revestimiento por fibroblastos.