



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO RESTROSPECTIVO DE LA APLICACION DE LA TECNICA HISTOLOGICA, INMUNOHISTOQUIMICA Y MICROSCOPIA ELECTRONICA EN EL DIAGNOSTICO DE LOS TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL".

5 C N  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :

GONZALEZ NIÑO CELENE SOFIA

ASESOR: M. E. C. ALMA ORTIZ PLATA



MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2002



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Estudio retrospectivo de la aplicación de la técnica histológica, inmunohistoquímica y microscopía electrónica en el diagnóstico de los tumores del sistema nervioso central".

realizado por González Niño Selene Sofía

con número de cuenta 8200378 0, quien cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M. en C. Alma Ortiz Plata

Propietario Dr. Jesús Daniel Rembao Bojorquez

Propietario Dra. Clara Esquivel Huesca

Suplente Dra. Guadalupe Trinidad Zavala Padilla

Suplente Bióloga Teresa Sosa Rodríguez

Consejo Departamental de

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGIA  
N.A.M.

Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

## **AGRADECIMIENTOS**

**A LOS MIEMBROS DEL H. JURADO POR LA REVISIÓN DE ESTE TRABAJO Y LAS VALIOSAS APORTACIONES QUE HICIERON AL MISMO PARA LLEGAR A SU CONCLUSIÓN:**

**M. en C. ALMA ORTIZ PLATA  
DR. JESÚS DANIEL REMBAO BOJORQUEZ  
DRA. CLARA ESQUIVEL HUESCA  
DRA. GUADALUPE ZAVALA PADILLA  
BIOL. TERESA SOSA RODRÍGUEZ**

**A EL PERSONAL DEL LABORATORIO DE NEUROLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA.**

**A LA M. en C. ALMA ORTIZ PLATA POR SU PACIENCIA, APOYO Y DEDICACIÓN PARA LA TERMINACIÓN DE ESTE TRABAJO.**

**ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO:**

A MIS PADRES LOS QUE QUIERO Y RESPETO POR SU DEDICACION, ENTREGA Y NOBLEZA , Y POR SUS ENSEÑANZAS Y CONSEJOS LOS CUALES SON LA BASE DE MI VIDA.

A MIS HERMANAS: MARIA, ALMA, FLOR, PATY, SONIA Y LOURDES YA QUE SIEMPRE QUE LAS NECESITO AHÍ ESTAN PARA APOYARME Y AYUDARME EN TODO, TANTO PERSONAL COMO MORALMENTE.

A MI ESPOSO CARLOS, EN EL QUE DEPOSITE MI CONFIANZA, AMOR Y CARIÑO DESDE EL DÍA EN QUE FUIMOS PAREJA.

A MIS HIJOS, DIEGO Y KARLA QUIENES SON FRUTO DE INSPIRACIÓN EN MIS LABORES, DESEANDO QUE SE REALICEN COMO PERSONAS EDUCADAS Y SENCILLAS Y EN QUIENES SIEMPRE CONFIARE Y AMARÉ , NO IMPORTANDO DISTANCIA NI TIEMPO.

A LA FAMILIA MAYORGA DOMÍNGUEZ, CARLOS, ELENA, PATRICIA, MARTÍN, JULIAN Y MARIA ELENA, POR SU APOYO Y RESPALDO HACIA NOSOTROS.

**A TODOS ELLOS GRACIAS.**

# INDICE

I.-RESUMEN	1
II.-INTRODUCCION	2
1. Antecedentes	2
a) Técnica histológica	2
b) Histoquímica	4
c) Inmunohistoquímica	4
d) Microscopia electrónica	5
2. Técnica Histológica	6
a) fijación	6
b) Deshidratación	9
c) Inclusión	11
d) Corte	12
e) Tinción	13
f) Montaje	14
3.- Histoquímica	15
4.- Inmunohistoquímica	16
5.- Microscopia electrónica	19
a) fijación	19
b) deshidratación	19

c) inclusión	20
d) corte	20
e) contraste	21
6.- Generalidades del sistema nervioso central	23
III.- OBJETIVOS	25
IV.- METODOLOGÍA	26
V.- RESULTADOS	28
VI.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	44
VII.- BIBLIOGRAFÍA	46

## I.- RESUMEN

El estudio histopatológico de las neoplasias del sistema nervioso central, implica la realización de técnicas de tinción desde las más sencillas como la hematoxilina y eosina, hasta las técnicas especiales, con las que se pueden evidenciar las características químicas y estructurales del tejido tumoral que ayudan en la identificación de la neoplasia en cuestión. El análisis histopatológico, incluye también la aplicación de métodos inmunohistoquímicos, los cuales ayudan a diferenciar el tipo de tumor de acuerdo a las características que presenten, detectadas por medio de anticuerpos específicos. En este trabajo se pretende evaluar la aplicación de las diferentes técnicas histopatológicas para conocer su importancia en el estudio de las neoplasias del sistema nervioso central.

Se estudiaron 537 biopsias, a las cuales se les realizó análisis por microscopia óptica que incluyeron las técnicas de hematoxilina – eosina, histoquímica e inmunohistoquímica con anticuerpos específicos de acuerdo a las características de la neoplasia en estudio, y en algunos casos también se realizó análisis por microscopia electrónica.

La mayor parte de las neoplasias que se encontraron fueron los adenomas de hipófisis (275 casos) y los que presentaron menor frecuencia fueron las neoplasias de la glándula pineal con 1 caso (ver tabla general).

En conclusión, la combinación de la técnica básica de rutina (Hematoxilina – Eosina), la histoquímica, la inmunohistoquímica y microscopia electrónica permiten tener una mejor interpretación de la neoplasia estudiada y así, dar un diagnóstico más exacto.



## II INTRODUCCION

### 1. -ANTECEDENTES

#### a) Técnica histológica

El conocimiento empírico de las técnicas histológicas puede remontarse a los egipcios con la conservación de cadáveres y el uso de los fijadores como el alcohol etílico para la momificación de los tejidos (Estrada y col. 1992).

El ejemplo más antiguo del empleo de colorantes en la anatomía microscópica es el relleno de los vasos capilares con sustancias coloreadas y al parecer fue Bengarius A Capri (1502 – 1567), el primero que usó este procedimiento.

Otro método es el teñido en rojo del tejido óseo en proliferación después de la alimentación de animales con Rubia (Rubia tinctorium) por Antonio Mizaldus en 1567.

Roberto Hooke (1635 – 1703) hace los primeros cortes histológicos en el corcho significativamente importantes por el descubrimiento de la célula y publicó en 1665 un libro llamado "Micrographia".

El advenimiento del microscopio abrió el campo para el nacimiento de una multitud de disciplinas científicas, entre ellas la histología.

El método de cortes fué utilizado primero en botánica, el micrótopo fue construido y descrito en 1770 por Georges Adams.

En el siglo XVIII Francois Bichat utilizó el término tejido para referirse a las diversas texturas de las capas y estructuras del cuerpo, por lo que se puede considerar a Bichat como el primer histólogo o fundador de la doctrina de los tejidos (Estrada 1992).

En el año 1856, se obtuvo el primer colorante de anilina por Henry Perkin. El verdadero éxito en la búsqueda de procedimientos útiles de tinción se obtuvo en la segunda mitad del siglo XIX, al ser introducidos por Bencke en 1862, los colorantes de anilina para teñir preparaciones microscópicas. En 1863 Wilhelm Waldeyer empleó la fucsina y ensayó el teñido de las fibras nerviosas con extracto de palo de Campeche (hematoxilina), abriendo con ello un horizonte de trabajo completamente nuevo.

El nacimiento de las anilinas ocasionó una revolución en la práctica de la Histología, por lo que la técnica histológica progresó a grandes pasos. Simultáneamente se fue desarrollando el procesamiento de los tejidos para lograr obtener cortes con la ayuda de los micrótomos, endureciendo adecuadamente los especímenes mediante congelación, inclusión en parafina y otras sustancias semejantes para evitar el desplazamiento de los componentes de los tejidos.

En 1881 se utilizó la primera combinación de hematoxilina – eosina y desde entonces se ha convertido en la técnica histológica más usada.

Actualmente la técnica histológica cuenta con contribuciones muy valiosas, afortunadamente la mayoría de los modernos métodos histológicos llevan el nombre de su descubridor y o modificador además de la fecha en que esto ocurrió, por lo que tienen una gran cantidad de información más o menos precisa, la cual nos permite tener una noción mas clara de los avances científicos que se dan en esta área (Estrada 1992).

## b) Histoquímica

La historia de la histoquímica está estrechamente ligada a la de la histología y ambas son indistinguibles en sus comienzos.

Desde 1800 se empezaron a realizar trabajos independientes de la histología en la histoquímica ( Estrada 1992).

Virchow en 1858 publica su obra de patología celular y la microscopia patológica surge como una disciplina fundamental de la medicina, con lo que se da inicio a un nuevo campo de estudio del tejido, la histotecnología.

En el periodo comprendido desde 1899-1929 se difunde mucho el empleo de los colorantes de anilina.

En el primer cuarto del siglo XIX surgió una rápida expansión de la histopatología.

## c) Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica y la inmunocitoquímica son disciplinas similares, que tienen los mismos fundamentos.

Este método fue introducido por Albert H. Conos, quien adoptó procedimientos inmunológicos para su empleo en cortes de tejidos (Banks 1999).

Inicialmente la inmunocitoquímica fué aplicada al análisis de la respuesta inmune a fin de identificar todas las células del organismo involucradas en la fijación de antígenos.

En la actualidad la inmunocitoquímica se extiende mas allá del estudio de la respuesta inmune, ya que intenta la localización de proteínas endógenas (Weiss 1986).

La inmunocitoquímica está basada en el uso de anticuerpos específicos como reactivos para localizar componentes moleculares.

A finales del siglo pasado, Metchnikoff observó que al introducir bacterias o un colorante en los tejidos de un equinodermo, éste material era inmediatamente rodeado por células móviles que lo ingerían y a veces lo destruían. Este fenómeno fue interpretado como un mecanismo inmune de protección y así la teoría celular de la inmunidad se le conoce con su nombre.

El primero en aplicar procedimientos inmunocitológicos con el fin de demostrar hormonas adenohipofisarias fue Marshall en 1951, quien produjo un antisuero contra ACTH de cerdo en conejos adrenalectomizados (Banks 1999).

#### d) Microscopia electrónica

Uno de los primeros trabajos hacia la construcción de los microscopios electrónicos, fue el de deBroglie en 1923 con sus avances teóricos sobre la naturaleza ondulatoria y corpuscular de un haz de electrones acelerados, que abrieron las posibilidades a trabajos experimentales, como los de Busch en 1926, en busca de lentes para haces electrónicos.

Basándose en los estudios de Broglie en 1931 Max Knoll construye el primer prototipo del microscopio electrónico (Santander 1966).

En 1932 se construyen dos microscopios electrónicos uno con lentes electrostáticas por Brüche y Johannson y otro con lentes electromagnéticas por Konll y Ruska.

En 1944 Von Ardenne logra fotografías demostrando un poder de resolución de entre 1.2 y 1.5 nm y en 1946 Hillier, obtiene 1 nm de resolución.

Por lo tanto el microscopio electrónico se originó en los primeros años de la década de los treinta y durante casi 20 años es perfeccionado (Vázquez-Nin 2000).

## 2. - TÉCNICA HISTOLÓGICA

a) Fijación.- El primer paso en el procesamiento de los tejidos es la fijación, la cual tiene como finalidad la de preservar la muestra, es decir, evitar la putrefacción y la autólisis, ya que son la causa de las rápidas modificaciones que experimentan las células al morir.

Durante este proceso se detiene la actividad biológica de los tejidos, de tal forma que se conservan a las células en un estado casi idéntico a cuando estaba viva, introduciendo pocas alteraciones en su estructura.

El fijador le da dureza y estabilidad a los tejidos uniendo sus grupos reactivos con los componentes celulares, preservándolos y confiriéndoles resistencia a todas las manipulaciones siguientes sin deformarse.

Algunos de los primeros procedimientos de fijación consistían en una breve inmersión en ácidos o disolventes orgánicos, tales como el metanol ( $\text{CH}_3\text{-OH}$ ), mientras que los procedimientos actuales incluyen la exposición de la célula a aldehídos, en particular formaldehído ( $\text{H}-\text{CHO}$ ) y glutaraldehído ( $\text{CHO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$ ) (Alberts 1997).

El formaldehído comercial presenta un cierto grado de acidez que afecta a los métodos de tinción, la cual se puede evitar con una solución amortiguada (generalmente formalina al 10 %) que se prepara con calcio (Lynch 1989).

El paraformaldehído es un fijador excelente para cortes ordinarios en parafina y es además el más usado.

El glutaraldehído es un fijador muy empleado para microscopía electrónica. También puede emplearse para trabajo ordinario con microscopio óptico, una de las ventajas del glutaraldehído es que los tejidos que se fijan con el se pueden almacenar en amortiguador por varias semanas o meses antes del estudio, y se empezó a usar en 1908 (Robertis1997).

Después de la fijación con glutaraldehído pueden llevarse a cabo muchas técnicas de tinción histoquímicas, de microscopía electrónica y microscopía óptica.

En algunos casos para mejorar la tinción de los tejidos fijados con formol se lleva a cabo una fijación secundaria o segunda fijación, en la que después de una o cuatro horas en formol, los bloques se dejan de 4 a 6 horas con cloruro mercúrico, adecuado para preservar el tejido que será sometido a técnicas inmunohistoquímicas, ya que no bloquea los sitios antigénicos que serán reconocidos por anticuerpos específicos.

Los ácidos minerales como el ácido crómico y el ácido ósmico (tetraóxido de osmio) son unos de los fijadores más empleados para investigar las estructuras celulares con microscopía electrónica. La fijación con tetraóxido de osmio fue mejorada con la introducción de una solución amortiguadora.

Entre las sales metálicas conocidas están el bromato de potasio, cloruro de platino y mercurio, pero los mas comúnmente empleados son aquellos que contienen mercurio. Este tipo de fijadores ordinarios son de elección para preservar los detalles cuando se quieren hacer fotografías (Estrada 1992).

**Fijación en alcohol.**-El alcohol metílico de 80 grados es un buen fijador para frotis, pero en concentraciones menores a 80 % produce lisis celular.

El alcohol etílico se emplea como fijador para las enzimas, pero en histopatología sólo se utiliza el líquido de Carnoy (alcohol etílico, cloroformo y ácido acético glacial).

La fijación con acetona actúa igual que el alcohol sólo que se utiliza en estudios de enzimas a temperaturas de cero grados centígrados.

Como todas las reacciones fisicoquímicas, la fijación se acelera por agitación y esta es una de las ventajas de los aparatos mecánicos. El calor moderado (37 a 56 grados centígrados) acelera la fijación.

Actualmente se han hecho modificaciones al proceso de fijación como es con el método de congelación desecación, el cual consiste en la rápida congelación del tejido y la deshidratación al vacío a baja temperatura.

La fase inicial de congelación, comienza con la introducción de pequeñas piezas de tejido en un baño a temperatura de - 160 a -190 grados centígrados enfriados con nitrógeno líquido, para lo cual también se ha empleado la fijación al vacío en helio líquido a una temperatura cercana al cero absoluto de -30 a -40 grados centígrados. de esta forma el hielo de los tejidos sublima directamente al estado gaseoso y se produce la deshidratación.

Las ventajas son que no causa retracción del tejido, la fijación es homogénea en toda la pieza y la composición química se mantiene prácticamente sin cambios conservando la estructura con pocas modificaciones, producidas por los cristales de hielo.

En el método de congelación y sustitución después de una rápida congelación, el tejido se mantiene congelado a baja temperatura ( -20 a -60 grados centígrados) en un reactivo que disuelve los cristales de hielo (etanol, metanol, acetona etc.) manteniéndolo entre los -20 a -70 grados centígrados durante uno a tres días o más, luego se deshidrata aclara e incluye en parafina (Robertis 1997).

En las biopsias de músculo también se lleva a cabo la preservación por congelación, ya que en estas biopsias además de las técnicas de rutina para microscopía óptica y electrónica también se realizan técnicas histoquímicas que permiten diferenciar los tipos de fibras musculares en base a su actividad enzimática que no son visibles con tinciones de rutina, por esto el fragmento de músculo se congela con nitrógeno líquido rápidamente para evitar como ya se mencionó, la formación de cristales de hielo dentro de las fibras, los cuales las distorsionan y ocasionan dificultades para la interpretación de los resultados (Banks 1999).

b) Deshidratación.-Los tejidos contienen gran cantidad de agua tanto intra como extracelular que debe ser eliminada y reemplazada por el medio de inclusión. Este proceso se denomina deshidratación, que se lleva a cabo mediante el uso de sustancias que se puedan mezclar con el agua de los tejidos de manera que pueda penetrar fácilmente entre las células.

La deshidratación se logra mejor utilizando alcoholes o acetonas de concentraciones graduales dependiendo del tejido a procesar y la técnica a seguir empezando por el de menor concentración. No es recomendable que se pase directamente del formol al alcohol concentrado (85-95%) ya que provoca distorsión de los tejidos debido a la cantidad de agua que presentan.



Posterior a la deshidratación, en algunos casos se lleva a cabo el aclaración, el cual permite que el alcohol de los tejidos sea reemplazado por un líquido que disuelva la parafina o el medio de inclusión a usar como son el éter, benceno, xileno, fenol, cresota etc. Además de eliminar el alcohol muchas de estas sustancias tienen la propiedad de volver transparentes los tejidos, no todos los agentes desalcoholizantes pueden actuar como aclarantes y viceversa.

En la microscopia electrónica después de la deshidratación, se emplea un intermediario que va a permitir que el alcohol sea reemplazado por el medio de inclusión que será la resina epóxica.

El xileno es un verdadero agente aclarante pero tiende a hacer que los tejidos sean muy duros y quebradizos, cuando se dejan por mas de 48 horas, sin embargo es el mas utilizado en técnicas histopatológicas.

Cuando la deshidratación no es bien realizada o incompleta, el xileno toma un aspecto lechoso cuando se le añade el tejido, lo cual es debido a que el xilol se hidrata.

El tolueno tiene las mismas propiedades generales que el xileno, pero resulta mejor porque endurece menos los tejidos, el aclaramiento requiere mas tiempo que con xileno.

El fenol en solución alcohólica concentrada resulta adecuado para trabajar con parafina y celoidina; el aclaramiento y la deshidratación son muy rápidos (Linch 1989).

c) **Inclusión.**-Es el último paso en el procesamiento de los tejidos la cual consiste en hacer penetrar en la pieza deshidratada un material solidificable que llene todas las cavidades naturales, espacios tisulares y aún los espacios intracelulares y que proporcione la consistencia firme necesaria para hacer cortes delgados sin provocar distorsión y sin alterar los tejidos.

En histología se emplean tres medios de inclusión que son la parafina, celoidina y gelatina.

En la actualidad se emplea ordinariamente la parafina, dejado para casos especiales la inclusión en los otros materiales. El método de celoidina es adecuado para muestras que tienen grandes cavidades o espacios huecos que tienden a colapsarse (ojos y embriones grandes) y la inclusión en gelatina que se usa muy poco en la actualidad.

Existe la técnica de la doble inclusión que busca una mayor facilidad para la preparación de cortes y consiste en dejar el tejido en una mezcla de partes iguales de absoluto y éter, celoidina y finalmente en parafina fresca.

La inclusión al vacío, se utiliza cuando los tejidos contienen mucho aire (pulmones), para porciones muy grandes de tejido y en aquellos que tienden a endurecerse con los métodos habituales, las ventajas de esta inclusión son que el tiempo de inclusión es menor que el habitual y la eliminación rápida de los reactivos aclaradores.

d) Corte.- El corte se lleva a cabo en micrótomos cuyo tipo dependerá de acuerdo al trabajo a desarrollar, forma en que se hizo la preparación y la inclusión del tejido.

Generalmente se consideran 5 clases de micrótomos: de deslizamiento, rotatorio, de balanceo, de congelación y para cortes ultra delgados (ultra micrótomo). Todos ellos con cuchillas tanto móviles o fijas y también según el plano de sección (vertical u horizontal).

El de deslizamiento o de carro, su ventaja es su sencillez mecánica, pues siendo pocas las partes móviles, se desgastan menos los componentes de precisión.

El rotatorio es probablemente el más empleado, no es conveniente para cortar bloques grandes, ni para piezas incluidas en celoidina, pero es mejor para hacer cortes en serie (Linch 1989).

El de balanceo es el más simple de todos, este se usa ampliamente en el extranjero.

El ultra micrótomo es usado generalmente para la microscopia electrónica ya que los cortes deben tener de 60 nm a 1 micra de grosor.

El de congelación se encuentra dentro de un aparato llamado crióstato y es enfriado con bióxido de carbono líquido (Linch 1989).

e) Tinción.- La tinción del corte permite estudiar la estructura de los tejidos y las relaciones entre las células que los constituyen.

En las tinciones se forma una unión molecular entre el agente colorante activo y los diferentes componentes de los tejidos, de manera que no se ve ninguna partícula de colorante y los tejidos conservan cierta transparencia salvo si la tinción es muy intensa.

La impregnación se hace a base de sales de metales pesados, que se precipitan sobre ciertos componentes de la célula o de los tejidos. El nitrato de plata es el agente que más se usa para la impregnación y puede comportarse como un colorante y destacar los elementos tisulares sin que haya formación de partículas.

Las tinciones específicas son la base de la histoquímica, ya que la identificación de ciertas estructuras o sustancias químicas se logra mediante reacciones químicas específicas, las cuales permiten dar una tinción en el lugar en que se encuentra la estructura o sustancia correspondiente en la célula o tejido.

En la teoría física de la coloración se ve a las coloraciones como una fijación mecánica de las materias colorantes, seguida de fenómenos de absorción que supone la atracción y fijación superficial hacia el tejido de moléculas pequeñas de material tintóreo que lo rodea (Estrada 1992).

En la teoría química se establece que el depósito de los colorantes en los tejidos, se lleva a cabo mediante una unión química entre el colorante y los elementos constituyentes del mismo, formándose una verdadera solución, de tal manera que las partes de la célula que tienen carácter ácido tienen afinidad por los colorantes ácidos.

Los colorantes se pueden clasificar en función de sus reacciones, en naturales o sintéticos, por sus afinidades tisulares y por sus aplicaciones principales.

f) Montaje.-Con el objeto de lograr mejor observación microscópica de los tejidos que se han teñido y aclarado, es necesario montarlos temporal o permanentemente durante períodos mas o menos prolongados, para evitar que se deformen o destruyan. Los montajes se efectúan normalmente en laminillas y el bálsamo de Canadá es el medio excelente de montaje.

### 3. - HISTOQUIMICA

La histoquímica es una rama especial de la histología que identifica los componentes de las células y los tejidos a través de reacciones químicas específicas (Banks 1999).

Las técnicas histoquímicas permiten demostrar, caracterizar y cuantificar las moléculas presentes en los tejidos (González Morán 1996). Son un método eficaz para aclarar problemas histofisiológicos, porque con ello es posible caracterizar cambios estructurales en el funcionamiento de los tejidos y células y confrontar esas observaciones con los resultados de los análisis químicos y bioquímicos (Cormak 1984).

Actualmente, la histoquímica no solamente es utilizada por citólogos y patólogos sino también por científicos de una gran variedad de disciplinas, y han contribuido en forma significativa a importantes descubrimientos tanto en el campo de la biología celular y molecular como para mejorar los procedimientos en el diagnóstico médico.

La histoquímica esta dividida en tres ramas:

- a) Histoquímica convencional: Cuyo objetivo es la localización de compuestos químicos, ya conocidos, ( iones, lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos) en zonas específicas o componentes celulares por medio del análisis bioquímico.
- b) Histoquímica enzimática: Las cuales ayudan a localizar el lugar de una enzima específica ( hidrolítica y oxidativa) por medio de un proceso químico semejante al que efectúa esta enzima *in vivo*.
- c) Inmunohistoquímica: Que es considerada como una técnica histoquímica de rutina para la identificación de constituyentes celulares de tejidos por medio de interacciones antígeno - anticuerpo (Pearse 1980 ).

#### 4. - INMUNOHISTOQUIMICA

En las últimas décadas, los métodos inmunológicos de laboratorio se han vuelto cada vez mas refinados y simplificados, ya que su finalidad es mejorar la precisión y exactitud de las pruebas de laboratorio, para asegurar la correcta interpretación y así poder evaluar la importancia de la introducción de nuevas pruebas (Stites 1988).

La inmunohistoquímica es un método que utiliza anticuerpos seleccionados para identificar antígenos específicos. Las pruebas son muy sensibles y pueden detectar cantidades muy pequeñas de una sustancia.

El organismo es capaz de reaccionar ante la presencia de sustancias extrañas (antígenos) y formar anticuerpos específicos que se combinan con los mismos. Los antígenos son macromoléculas de proteínas o polisacáridos y los anticuerpos son proteínas producidas por las células plasmáticas del tejido linfoide del organismo, que circulan por la linfa y la sangre (Geneser 1997), de esta forma la reacción entre en el antígeno y su anticuerpo es extremadamente específica.

El anticuerpo lleva una marca que puede visualizarse en los microscopios óptico y electrónico . Este método fue introducido por Albert H. Conos ( 1951), quien adoptó procedimientos inmunológicos para su empleo en cortes de tejidos (Weiss 1996).

Existen tres métodos para realizar el marcaje de anticuerpos:

- a) técnica de anticuerpo fluorescente: Las moléculas de colorantes fluorescentes se unen químicamente a las moléculas de anticuerpos lo cual hace posible observar con el microscopio de luz ultravioleta los sitios de reacción con los antígenos; usada para localizar principalmente proteínas como la miosina.

- b) Técnica con compuestos diseminadores de electrones: Estos compuestos son para el uso en la microscopía electrónica. El anticuerpo se une con la proteína ferritina, que contiene hierro, o con partículas de oro de diferentes tamaños que son electrodensas y se pueden identificar ultraestructuralmente.
- c) Técnica con enzimas: Los anticuerpos pueden tratarse con la enzima peroxidasa para identificar los complejos antígeno – anticuerpo, además de la peroxidasa pueden usarse otras enzimas como la fosfatasa alcalina y la galactosidasa (González Morán 1996).

De entre los marcadores celulares más importantes en el diagnóstico de las neoplasias son:

- a) productos celulares: Hormonas, enzimas e inmunoglobulinas.
- b) Filamentos citoplásmicos: citoqueratinas, vimentina y proteína glial fibrilar ácida.
- c) Antígenos asociados a tumores: antígeno oncofetal y antígeno específico de tumores ( Banks 1999).

#### Método de la peroxidasa

En las neoplasias hipofisarias, Nakane y Pierce (1966), descubrieron el marcaje de anticuerpos por la conjugación con la peroxidasa de rábano, la cual es fácilmente visualizada en tejidos usando a la diamnobencidina como revelador. En 1968 Nakane demostró la presencia de hormonas adenohipofisarias en la hipófisis anterior aplicando el método de la inmunoperoxidasa, la técnica de Nakane fue modificada por Mason en 1969 quien introdujo un puente enzimático que es un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, el cual a su vez se une al anticuerpo primario.



Sternberger en 1974, desarrollo otro método basándose en el de Mason, en el cual el segundo anticuerpo o puente, no está marcado y se aplica un tercer componente llamado el reactivo PAP, el cual consiste de complejos inmunes de la enzima peroxidasa y de anticuerpos peroxidasa, derivados de las mismas especies del anticuerpo primario. El segundo anticuerpo ya unido al primario, se une al PAP cuando este es agregado. La unión en mayor cantidad de la enzima por antígeno, amplifica la reacción y eleva la sensibilidad.

Por último en 1979 Guesdon realizó otra modificación a la técnica, la cual se basa en la afinidad de la biotina, que es una vitamina que puede ser conjugada a proteínas, por la avidina, una glicoproteína derivada del huevo, en donde la reacción es irreversible. En este método el segundo anticuerpo y la enzima peroxidasa son biotinilados. La biotina en la enzima peroxidasa es unida con la avidina, la cual, debido a que esta puede combinarse con 4 moléculas de biotina, también se une a la biotina en el segundo anticuerpo, formando un puente biotina - avidina, entre la enzima y el segundo anticuerpo. A través de esta afinidad biotina - avidina, se incrementa la sensibilidad del ensayo más que en la técnica de PAP (Ashton 1985)

## 5. - MICROSCOPIA ELECTRONICA

a) Fijación.- La fijación de tejidos para microscopía electrónica se realiza generalmente en glutaraldehído al 2.5% amortiguado en fosfatos o cacodilatos 0.1 M a pH 7.4, ya que si se emplean amortiguadores de amina, como el tris, reacciona con el glutaraldehído.

Una de las ventajas del glutaraldehído es la capacidad de preservación de los tejidos a un nivel ultraestructural aunque su velocidad de penetración es lenta, los tejidos que se fijan con el se pueden almacenar en amortiguador por varias semanas o meses antes del estudio. Después de la fijación con glutaraldehído se lleva a cabo una post - fijación con tetraóxido de osmio al 1% en el mismo amortiguador que el fijador, éste estabiliza los tejidos.

b) Deshidratación.- Las etapas iniciales de deshidratación son semejantes a las empleadas para la técnica de parafina, ésta se realiza con líquidos que se mezclan con el agua celular que al aumentar su concentración la desplazan, hasta sustituirla totalmente.

En general se emplea etanol o acetona, en donde se sumergen los tejidos, siendo el etanol el más empleado por ser mejor deshidratante.

Después de la deshidratación con etanol y cuando se quiere incluir los tejidos en resina epóxica, es necesario emplear un intermediario, el óxido de propileno, el cual es el solvente mas utilizado, que al mezclarse con el etanol queda incorporado a nivel molecular en los tejidos disminuyendo la viscosidad de la resina y permitiendo la penetración en los mismos.

La acetona es más miscible con los principales medios de inclusión, por lo que no es necesario un intermediario.(Linch 1989 . Estrada 1992, Banks 1999).

c) Inclusión.- El propósito de la inclusión es manejar el tejido en un medio sólido que tenga la fuerza suficiente para obtener cortes finos.

Los primeros cortes para microscopio electrónico se obtuvieron con ceras duras pero en 1949 se empleó el butilmetacrilato. Después han sido casi totalmente sustituidos por plásticos con puentes químicos transversales (Araldita y Epon) con mejores cualidades, entre ellas ser más transparentes y estables al haz electrónico y no producen daños por polimerización al tejido.(Vázquez-Nin, Echeverría 2000)

d) Corte.- Los bloques en donde se encuentran incluidos los tejidos deben ser sometidos a una preparación antes de ser cortados. Después de haber transcurrido por lo menos 24 hrs. de la polimerización en la estufa con el objeto de que al reposar a temperatura ambiente se equilibren las fuerzas internas de la polimerización.

Para la realización de los cortes son necesarias cuchillas especiales fabricadas con materiales duros, ya que la consistencia de los medios de inclusión de los tejidos es también dura. Al principio se utilizaron cuchillas de acero y en 1950 se introdujeron cuchillas de cristal, las cuchillas de cristal son pequeños triángulos con ángulo recto y dos agudos de 45 grados.

En 1956 se introdujeron las cuchillas de diamante que pueden ser ángulos agudos de 45 grados apropiados para casi todos los cortes histológicos, también se usan los ángulos obtusos de 60 grados y son recomendables para materiales duros.

Los cortes para ser observados al microscopio electrónico deben ser ultra finos, cuyo grosor va de 60 - 150 nanómetros, para lo que se recurre al método indirecto de apreciación de grosor mediante los colores de interferencia de la luz al refractarse sobre ellos. Es sabido que la luz blanca al incidir sobre el corte lo ilumina de diferentes colores según el grosor del mismo. Los cortes de color gris son los mas utilizados, aunque también se obtiene un buen rendimiento con los de color plateado e incluso con los dorados aunque a muy bajos aumentos, los colores restantes no se utilizan por ser muy gruesos y el haz de electrones no los atravesaría. Los cortes para ser observados al microscopio de luz deben ser de aproximadamente 1 micra de grosor (color verde).

e) Contraste.- Los cortes incluidos en plásticos se pueden teñir de dos maneras principalmente: con colorantes ordinarios utilizados para microscopía óptica y con compuestos opacos a los electrones para microscopía electrónica. La tinción más útil es la de azul de toluidina por sus propiedades meta cromáticos que aumentan el contraste.

Durante el contraste de los cortes ultra finos se debe evitar la contaminación con polvo, partículas diversas o precipitados. La base del contraste es la fijación de átomos pesados a los distintos elementos celulares y tisulares, para que dichos átomos absorban y dispersen los electrones, formándose así una imagen.

Watson en 1958 estudió el empleo de las sales de uranio y vió que la mejor era el acetato de uranilo para las proteínas y el citrato de plomo para las membranas celulares.

El contraste con hidróxido de plomo alcalino (pH 11 y 12) se debe a la producción de cationes poliméricos a partir de compuestos de plomo complejos, sin embargo si la fijación se hizo con tetraóxido de osmio, el hidróxido de plomo reacciona principalmente con el osmio reducido en los tejidos, comportándose como un contrastante general. Naturalmente, el propio osmio reducido es opaco a los electrones y representa un contrastante general de baja intensidad. El hidróxido de plomo alcalino se puede emplear sólo o de manera secundaria, después de aplicar acetato de uranilo y después mucho la práctica que consiste en contrastar con acetato de uranilo y después hidróxido de plomo, pues se ha visto que esta combinación aumenta la intensidad de la imagen.

## 6.- GENERALIDADES DE TUMORES DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso tiene como función la comunicación, la cual depende de la capacidad particular de las células nerviosas y de sus prolongaciones de producir y transmitir señales.

El sistema nervioso está dividido en dos partes de acuerdo a su función: sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está constituido por el encéfalo y la medula espinal, contiene gran número de células nerviosas o neuronas. Todos los elementos del SNC se encuentran distribuidos en la sustancia gris y en la sustancia blanca.

En la gris se encuentran los cuerpos celulares de las neuronas, sus dendritas y las porciones proximales de los axones. Rodeando a la sustancia gris, hay una zona desprovista de cuerpos neuronales, esta zona es la sustancia blanca, llamada así porque los axones están revestidos de mielina que tienen un color blanco brillante.

El SNC está formado también por células de soporte no nerviosas llamadas células neurogliales (neuroglia) y células microgliales (microglia). Las células neurogliales están representadas por los Astrocitos y los Oligodendrocitos. Los astrocitos son de dos clases: protoplásmicos y fibrosos ( Geneser 1997).

Los tumores del sistema nervioso mas frecuentes son los gliomas los cuales se dividen en 3 tipos: astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas, de bajo o alto grado de malignidad.

La organización Mundial de la Salud (OMS ) para la clasificación de las neoplasias cerebrales toma en cuenta los siguientes aspectos:

Hallazgos morfológicos, conducta biológica, derivación citogenética, parecidos ontogenéticos y la expresión inmunopatológica.

Los astrocitomas constituyen aproximadamente un 80% de los tumores cerebrales, los cuales morfológicamente presentan una gran cantidad de prolongaciones citoplásmicas, y una tendencia marcada a volverse más anaplásicos con el tiempo.(De Angelis M.L 20001)

Los oligodendriogliomas presentan una frecuencia aproximada del 5% de todos los gliomas.

### **III.-OBJETIVOS**

- 1.- Conocer las diferentes tinciones histológicas e inmunohistoquímicas que se aplican en el análisis de los tumores del Sistema Nervioso Central.**
- 2.- Conocer los tipos de tumores más frecuentes que se presentan en el Sistema Nervioso Central, en el departamento de neuropatología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.**
- 3.-Resaltar la aplicación e importancia de la Histología en el estudio de los tumores del Sistema Nervioso Central.**



#### IV.-METODOLOGIA

Se analizaron 537 biopsias de diferentes tumores del sistema nervioso central que fueron procesadas durante el período comprendido entre 1992 y 1994, en el departamento de Neuropatología Experimental.

Cada biopsia fué dividida en dos partes, la primera parte de la muestra fué procesada para microscopía electrónica para lo cual se seccionó el tejido a un tamaño de 3 milímetros cúbicos aproximadamente y se fijó en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilatos de sodio 0.1 M pH 7.2 por una hora.

Después sé post- fijó en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo amortiguador, se deshidrató en acetonas de concentraciones graduales del 70% al 90% con un cambio de 10 minutos, cada uno y 2 cambios de 10 minutos en acetona absoluta y resina epóxica. Posteriormente se preincluyeron en una mezcla de acetona absoluta y resina epóxica(1:1), durante toda la noche.

Posteriormente se realizaron cortes de una micra de espesor, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron en microscopio óptico. Por último se hicieron cortes ultra finos aproximadamente de 60 nm, los cuales fueron contrastados con acetato de uranilo por 15 min. citrato de plomo por 10 min. fueron analizados en un microscopio electrónico de transmisión EM 10 A.

La segunda parte de la muestra fué fijada en formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.2, deshidratado en alcoholes de concentraciones graduales crecientes y aclarado en xilol en cambios de una hora cada uno y por último fue embebido e incluido en parafina.

Todo esto fué realizado en un procesador automático de tejidos Histokinette Reichert – Jung 2000. Se realizaron cortes de aproximadamente 4 micras, colocándolas en un baño de flotación a 37 centígrados con gelatina previamente disuelta para que se extienda y se adhiera al portaobjetos.

Las secciones fueron desparafinadas en xilol absoluto en dos cambios de 15 min.cada uno e hidratados con cambios de 3 min. en xilol-alcohol 96%, alcohol 70% y agua destilada;

Posteriormente todos fueron teñidos con hematoxilina y eosina y en casos necesarios se aplicaron técnicas histoquímicas especiales como Reticulina, Tricrómico de Masson, Acido peryódico de Shiff (PAS) , Fontana –Masson e inmunohistoquímica contra diferentes anticuerpos: EMA, vimentina, proteína glial fibrilar ácida, proteína s100, cito queratina, y en el caso específico de adenomas se aplicaron los anticuerpos policlonales primarios, contra cada una de las hormonas adenohipofisarias como: prolactina, hormona de crecimiento, hormona estimulante del folículo, hormona luteinizante, hormona estimulante de la tiroides, y adenocorticotropina, obtenidos en la compañía INC inmunoBiologicals.

## V.-RESULTADOS

De las 537 biopsias estudiadas en el departamento de Neuropatología experimental, las neoplasias que más se presentaron fueron los Adenomas de hipófisis.

En general se les aplicaron las técnicas de Hematoxilina – Eosina, especiales, inmunohistoquímica y microscopía electrónica según el caso (Tabla I)

Las neoplasias se clasificaron de la siguiente manera:

- a) Neoplasias Gliales (100 casos), de los cuales 19 fueron astrocitomas de bajo grado de malignidad, 2 astrocitomas de alto grado de malignidad, y de las variantes como Astrocitoma gemistocítico (1 caso), astrocitoma subependimario (1 caso), astrocitoma pilocítico (1 caso), oligodendroglioma (2 casos), oligoastrocitoma (2 casos).

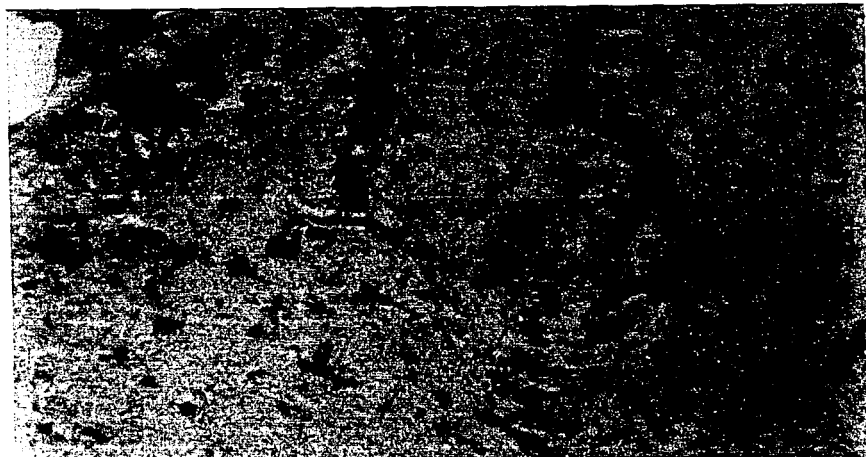
La técnica de tinción aplicada fue la de H- E con la que se observó que el patrón histológico que predominó fue el neurofibrilar, con poblaciones celulares uniformes, con citoplasma astrocítico, núcleo pequeño y central con diversos grados de atipia nuclear consistentes en diferencias en tamaño y forma, resaltando irregularidades de la membrana nuclear e hiper cromasia. En los casos neoplásicos de alto grado de malignidad, estos cambios fueron más intensos, resaltando el pleomorfismo, alto índice de mitosis y como acompañante constante la necrosis e hiperplasia endotelial

El sexo que más se presentó en este tipo de tumores es masculino, con edad promedio de presentación de 41 años.

En los Glioblastomas (30 casos), y astrocitomas anaplásicos (44 casos) fueron los tumores que se presentaron mas frecuentemente con alto grado de malignidad, con una edad promedio de presentación 49 años, siendo el sexo masculino el mas encontrado, se les aplico primero la técnica de H-E, la cual mostró un incremento de la densidad celular, un pleomorfismo nuclear y citoplásmico, una proliferación endotelial vascular, y un gran incremento en mitosis.

Para investigar la naturaleza de las células tumorales, se realizaron técnicas de inmunoperoxidasa, usando anticuerpos anti antígeno epitelial de membrana (EMA) para detectar origen epitelial, y anti proteína glial fibrilar acidica (PGFA) (FIG. 1).

Con la técnica de Tricrómico de Masson se observaron muchas fibras de colágena.



**Figura 1. Se muestra un glioblastoma con la técnica de inmunohistoquímica contra anticuerpo PGFA. La flecha señala una célula marcada positivamente (160 x)**

b) neoplasias endimarias, se diagnosticaron 11 casos, de los cuales 10 fueron endimoma, y 1 subendimoma. El promedio de presentación fue de 33 años de edad y la mayor frecuencia fue para el sexo masculino (3:1), todos de bajo grado de malignidad.

La técnica de H-E fue suficiente para dar un diagnóstico, la cual mostró una neoplasia altamente celular, con disposición celular predominantemente perivascular, formando pseudo-rosetas, las cuales son la característica distintiva de estos tumores y son útiles para el diagnóstico. Los núcleos de estas células son basales, nucleolo aparente, y el citoplasma es eosinófilico.

c) neoplasias de la Glándula pineal sólo hubo un caso de pineocitoma, con una edad promedio de presentación a los 35 años de edad, femenino al cual se le practicó la técnica de H-E que mostró lo siguiente: cápsula bien delimitada, con grupo de células epiteliales con estroma laxo, teñidas de color oscuro; y con gotas de mucina, ocasionalmente presencia de necrosis.

d) neoplasias Neuronales fueron 5 neuroblastomas, con edad promedio de presentación de 35 años de edad, con relación hombre – mujer 3:2. Todos con alto grado de malignidad y solo se aplicó técnica de H – E que mostró: células pequeñas, indiferenciadas formando rosetas, con estroma de tejido conectivo, y alto índice de mitosis.

e) neoplasias embrionales fueron 13 meduloblastomas en donde el sexo masculino fue el más frecuente con promedio de presentación de 25 años de edad, todos con alto grado de malignidad, y sólo se les practico la técnica de H-E que mostró una neoplasia con núcleos densos, redondeados o en forma de zanahoria, los cuales forman grupos grandes, separados por numerosos vasos sanguíneos.

El citoplasma de las células tumorales es de límites poco evidentes, con algunas mitosis.

f) Neoplasias de la vaina nerviosa, se presentaron 18 casos de Schwannoma, con una edad promedio de presentación 35 años de edad, con mayor frecuencia en el sexo femenino.

Neurofibromas 3 casos, con mayor frecuencia en el sexo femenino (2:1), todos con bajo grado de malignidad y con promedio de presentación de 25 años de edad, y sólo se les aplico técnica de H-E que mostró una proliferación de células de Schwann, con núcleos angulados o en espiral.

Hay además proliferación de fibroblastos con abundantes fibras de colágena, formando una red fibroconectiva.

g) Neoplasias de Meninges, están divididos en dos:

Meningioma, 68 casos, con promedio de presentación de 45 años de edad, el sexo femenino fue el más frecuente y se les aplicaron la técnica de H-E, que encontró una neoplasia celular, con núcleos claros y ovals, nucleolos delicados y citoplasma poco nítido anfófilico. En algunas áreas las células neoplásicas adquieren un aspecto xantomatoso y forman prominentes nódulos y remolinos celulares (FIG. 2 a).

Posteriormente se realizaron las técnicas de Tricrómico de Masson, para distinguir colágena y queratina, y Fontana – Masson para diferenciar melanina y gránulos de tejido fibroconectivo, la técnica de inmunoperoxidasa contra queratina, antígeno carcino embrionario y proteína S100, sólo se

realizó en algunos casos ( 4) para conocer el origen celular y por último en microscopia electrónica se observó una compleja ínter digitación de las membranas celulares unidas por un desmosoma ( FIG. 2b).

Y el sarcoma fue sólo un caso con una edad de 63 años, femenino, se le aplico la técnica de H-E ,la cual mostró una neoplásia constituida por elementos altamente pleomórficos, con núcleos densos, con gran variación de forma y tamaño y citoplasma escaso.

En tales células circunda abundante tejido osteoide, el cual está parcialmente calcificado.

H) neoplasias Melanócíticas, solo se diagnosticaron 4 casos de melanomas, 3 femeninos, de 45,30 y 48 años de edad promedio de presentación y 1 masculino de 21 años de edad promedio de presentación, se le aplicó la técnica de H-E que mostró tejido neoplásico con células de núcleos redondeados, nucléolos prominentes y eosinofílicos, el citoplasma con límites poco nítidos, presencia de melanina y alto índice de mitosis, con la técnica de Fontana- Masson, en el citoplasma se encontraron en algunas de las células material finamente granuloso que se tiñeron de negro, lo cual indica presencia de melanina.

También se realizaron técnicas de Inmunoperoxidasa, para proteína S100 (+), antígeno epitelial de membrana (EMA) (+), proteína glial fibrilar acidica (PGAF) (-) y HMB – 45 (+).

i) Neoplasias originados en vasos sanguíneos, fueron: hemangioblastoma 3 de 56, 54, y 42 años de edad promedio de presentación, femeninos, con alto grado de malignidad y solo técnica de H-E, la que mostró: Una neoplasia constituida por elementos redondeados, de núcleos ovalados densos algunos con el citoplasma de aspecto espumoso, circundadas por numerosos canales vasculares, no se observaron figuras de mitosis o atípia celular.



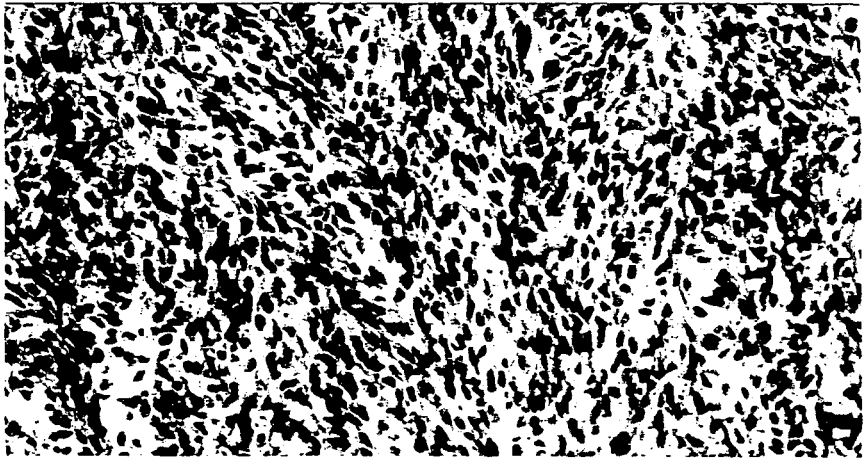
j) Neoplasias germinales (22), Germinoma, 2 casos, masculinos 16 y 38 años de edad, con alto grado de malignidad solo técnica de H-E que mostró: dos poblaciones celulares diferentes, una representada por nidos de células grandes, diferenciadas, redondas, con cromatina fina y nucléolo aparente, a veces presentan picnosis. La otra línea celular la representan abundantes linfocitos

Carcinoma, 20 casos, femeninos en su mayoría, promedio de 38 años de edad, y con alto grado de malignidad, la técnica de H-E mostró un tejido neoplásico altamente pleomórfico, el tejido nervioso presenta gliosis astrocítica, formando grupos celulares separados por septos conjuntivos, con numerosas mitosis y amplias áreas de necrosis.

Posteriormente se realizó la técnica de PAS que mostró células grandes con uno o más núcleos claros y grandes, con 4 nucleolos evidentes y citoplasma abundante de límites nítidos, y con numerosos figuras de mitosis, la tinción fue positiva encontrándose glucógeno, mucina y membranas basales.

También se realizaron tinciones inmunohistoquímicas usando anticuerpos contra PGFA y EMA.

Con la PGFA se marcaron las células astrocitarias del tejido nervioso periférico al tumor, con EMA las células tumorales se marcaron de forma muy intensa y en otros casos se realizaron inmunohistoquímica con EMA, citoqueratina, sinaptofisina y LCA.



**Figura 2 a. Meningioma teñido con técnica H -E que muestra una neoplasia con núcleos claros y ovals, nucleolos delicados y citoplasma poco nítido (160 x).**



Figura 2 b. Meningioma analizado al microscopio electrónico, en el que se observan procesos citoplásmicos interdigitados (flecha chica), desmosomas (flecha curva) y tono filamentos (T) ( 11100 x).

k) Neoplasias de origen mesenquimal se diagnosticaron 9 cordomas, con edad promedio de presentación de 55 años, el sexo femenino presento una proporción de 7:1 contra el masculino, la técnica de H-E mostró una neoplasia constituida por células con citoplasma eosinofílico vacuolizado, formando grupos o cadenas separadas por una matriz mucoide, basofílica. No se observan mitosis, también se les realizaron microscopia electrónica

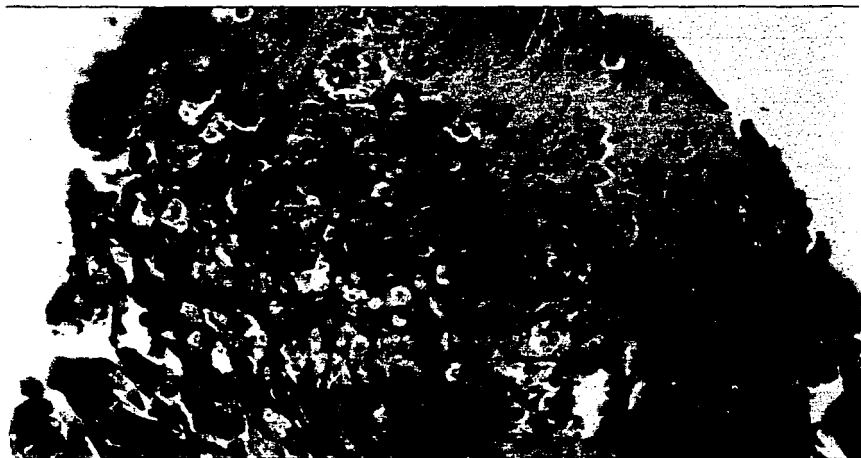
Condrosarcoma con 3 casos femeninos, de 74, 78, y 76 años de presentación, con alto grado de malignidad y con la técnica de H- E se encontró una neoplasia de línea cartilaginosa, discretamente celular, en que hay una célula por laguna las cuales tienen citoplasma retraído y núcleos densos, irregulares, y no presencia de mitosis.

l) Neoplasias de hipófisis fueron los más abundantes con 275 casos, con una edad promedio de presentación de 50 años, la mayoría masculinos, la técnica de H - E mostró una neoplasia de células de tamaño mediano, uniformes, con límites citoplásmicos nítidos y núcleos densos, redondeados que varían poco en forma y tamaño, no presentó figuras de mitosis.

Con la técnica de PAS, los prolactinomas y los somatotrófos salieron negativos, y los adenomas gonadotrofos, tirótrofos y ACTH resultaron positivos ( FIG. 3 ).

Con la técnica de reticulina para colágeno, se observó un desarreglo histológico provocado por las células neoplásicas (FIG. 4 ).

En el caso de la inmunoperoxidasa se usaron sueros anti lambda y anti kappa, también para las hormonas hipofisarias, Adenocorticotrofina (ACTH), Hormona de crecimiento (STH), Hormona folículo estimulante (FSH), Prolactina (PROL), Hormona estimulante de tiroides(TSH), y Hormona luteinizante (LH).



**Figura 3. Adenoma hipofisario teñido con la técnica de PAS. La flecha señala las células que denotan su contenido glucoprotéico.**

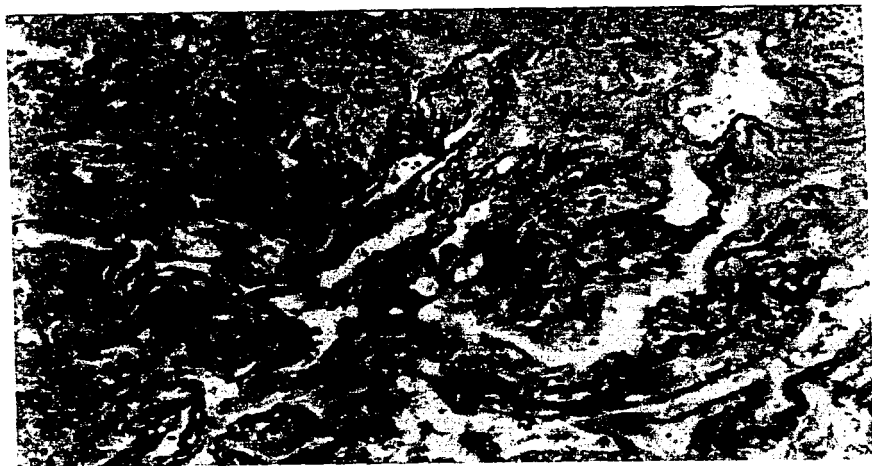


Figura 4 Adenoma hipofisiario con la técnica de reticulina, la cual muestra el desarreglo histológico provocado por células neoplásicas (flecha curva), y el retículo (flecha chica) (160x).

En microscopia electrónica las células neoplásicas tienen límites citoplásmicos lisos, sin indentaciones, ni uniones intercelulares. Los núcleos tienen forma irregular y muestran heterocromatina en grumos, tendiendo a aplicarse en contra de la envoltura nuclear, su nucleolo es muy evidente y los gránulos de secreción son muy escasos y pequeños (FIG. 5 ).



**Figura 5 Adenoma hipofisiario productor de hormona de crecimiento, analizado al microscopio electrónico, que presenta como característica, acúmulos fibrosos en su citoplasma (4350x) (flecha chica).**



## RESULTADOS GENERALES

TIPO DE NEOPLASIA	No. DE CASOS
NEOPLASIAS GLIALES	100
N.EPENDIMARIAS	11
N.DE CEL.PINEAL	1
N.NEURONALES	5
N.EMBRIONALES	13
N.DE VAINA NERVIOSA	21
N.DE MENINGES	69
N.MELANOTICAS	4
N.ORIGINADAS EN VASOS SANGUINEOS	3
N.GERMINALES	23
N.DE HIPOFISIS	275
N.DE ORIGEN MESENQUIMAL	12

TABLA I : Resumen de las neoplasias analizadas

## TABLA GENERAL

GRUPO CELULAR	NEOPLASIA	GRADO DE MALIGNIDAD	# DE CASOS	TECNICA HISTOLOGICA
NEOPLASIAS GLIALES	ASTROCITOMA	BAJO	18	H-E, M.E
	A.GRADO I	BAJO	1	H-E,
	GEMISTOCITICO	BAJO	1	H-E
	SUBEPENDIMARIO	BAJO	1	H-E
	PILOCITICO	BAJO	1	H-E
	ANAPLASICO	ALTO	44	H-E, M.E,INMUNO
	OLIGODENDROGLIOMA	BAJO	2	H-E
	OLIGOASTROCITOMA	BAJO	2	H-E,M.E
	GLIOBLASTOMA	ALTO	30	H-E.RETICULINA,INMUNO
NEOPLASIAS EPENDIMARIOS	EPENDIMOMA	BAJO	10	H-E
	SUBEPENDIMOMA	BAJO	1	H-E
N. DE GLANDULA PINEAL	PINEOCITOMA	BAJO	1	H-E
	NEUROBLASTOMA	ALTO	5	H-E
N. EMBRIONALES	MEDULOBLASTOMA	ALTO	13	H-E
N. DE VAINA	SCHWANOMA	BAJO	18	H-E
NERVIOSA	NEUROFIBROMA	BAJO	3	H-E
NEOPLASIAS DE MENINGES	MENINGIOMA	BAJO	68	H-E.FONTANA,GROCCOTT
	SARCOMA	ALTO	1	H-E.GROCCOTT,INMUNO
N.MELANOTICOS	MELANOMA	ALTO	4	H-E.FONTANA,INMUNO
N.ORIGINADOS EN VASOS SAN.	HEMANGIOBLASTOMA	ALTO	2	H-E
	SARCOMA	ALTO	1	H-E.GROCCOTT,INMUNO
NEOPLASIAS GERMINALES	GERMINOMA	ALTO	2	H-E
	CARCINOMA	ALTO	20	H-E,INMUNO,CITOQUERA,
N.DE HIPOFISIS	ADENOMA	BAJO	275	H-E,PAS,RETICULINA,M E
N.DE ORIGEN MESENQUIMAL	CORDOMA	ALTO	9	H-E,M.E
	CONDROSARCOMA	ALTO	3	H-E,M-E.

TABLA II : Análisis de las Neoplasias por tipo celular y Técnicas aplicadas.

## VI.-DISCUSION Y CONCLUSIONES

La técnica de H-E se emplea en Histología porque permite apreciar ciertos componentes estructurales de los tejidos histológicos. Este procedimiento técnico se ha mantenido sin cambios por más de medio siglo y seguramente perdurará por muchos años más. La razón de su éxito es su extraordinaria eficacia, rapidez y economía. Sin embargo aunque esta técnica básica de rutina (H- E) es una herramienta importante para el diagnóstico de tumores del sistema nerviosos central, ya que es el primer paso que se lleva a cabo con la muestra recibida y es suficiente para que el patólogo pueda tener información completa, hay situaciones en los cuales este procedimiento no es suficiente para establecer el diagnóstico y es necesario aplicar técnicas adicionales o especiales, cada vez más complejas, que se han venido incorporando como valiosos auxiliares.

Una de estas herramientas son las tinciones histoquímicas que se basan en la utilización de diversas sustancias específicas que reaccionan con componentes celulares evidenciándolos con colores diferentes.

En las neoplasias del sistema nerviosos central analizadas, se aplicaron las técnicas de Tricrómico de Masson, Gomcri, PAS, y Grocott, con las cuales fue posible dar el diagnóstico de las neoplasias como ependimomas, sarcomas, astrocitomas etc.(ver tabla II)

Más recientemente, el empleo de técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica, han permitido un mejor desarrollo tanto de la patología experimental como de la patología quirúrgica, ya que la inmunohistoquímica ha probado ser una forma más específica de localizar y caracterizar moléculas in situ.

La aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas en casos especiales de patología, permiten efectuar diagnósticos más precisos, debido a que se aplican anticuerpos que reaccionan con antígenos específicos del tejido, que funcionan como marcadores de cada estirpe celular.

La microscopia electrónica ha contribuido enormemente al mejor conocimiento de la estructura subcelular tanto en tejidos normales como patológicos. Aunque la mayoría de los diagnósticos se realizan con la técnica de H -E existen casos (entre 1 y 8%) (Hernández- Pando 1992) que no pueden clasificarse ni aún con técnicas histológicas, o inmunohistoquímicas. En estos casos la microscopía electrónica contribuye al diagnóstico definitivo, al mostrar estructuras específicas del grupo celular que no pueden ser observadas con el microscopio óptico. Un ejemplo de esto son los adenomas hipofisarios, los cuales presentan características ultra estructurales dependiendo de la hormona que secreten.

En conclusión, la combinación de la técnica básica de rutina con la histoquímica, inmunohistoquímica y la microscopia electrónica permiten mejores interpretaciones para un diagnóstico exacto, para posteriormente, cuando sea necesario identificar alteraciones a nivel molecular mediante el empleo de otros métodos de la Biología contemporánea.

## VII.-BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ashton J.K. 1985 "Inmunoperoxidase staining techniques and applications". Lab. Management, August.
- 2.- Alberts M. N. 1997 "Biología celular y molecular" Edit. Interamericana México.
- 3.- Banks.1999 "Histología Veterinaria Aplicada". Edit. El manual moderno Méx. Distrito Federal.
- 4.- Cornmack D.H 1984 " Tratado de Histología". Editorial Interamericana. México. Distrito Federal.
- 5.- De Angelis L.M. 2001"Brain tumors". The New England Journal of Medicine vol. 344, No. 2 January
- 6.- Estrada E., Peralta L., Rivas M., 1992 "Manual de técnicas histológicas". AGT Editor México D.F.
- 7.- Geneser P. 1997 "Histología "edit. Interamericana. México,D.F
- 8.- González Morán Genoveva 1996 "Técnicas de Histología". AGT editor México D. F.
- 9.- González Santander. 1966 "Técnicas de microscopía electrónica en Biología" Edit. Aguilar, Madrid España
- 10.- Hernández P; Larriva S; 1992 "Técnicas contemporáneas en patología: principios, virtudes y limitaciones" .Revista de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Nutrición. México
- 11.- Linch G. 1989 " Técnicas de laboratorio" Edit. Interamericana , México
- 12.- Prophet, Mills , Arrington .- 1992 "Métodos histotecnológicos". Instituto de patología de las fuerzas armadas de los Estados unidos de América
- 13.- Pearse A. 1970 "Histoquímica". Edit. Aguilar, Madrid España.
- 14.-Robertis y Robertis 1997 "Biología celular" Edit. Interamericana, México

15.-Stites P.D. 1988 "Inmunología Básica y clínica". Edit. El manual Moderno México D.F.

16.- Vázquez- Nin Gerardo, Olga Echeverría.- 2000 "Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas." Fac. Ciencias UNAM. México.

17.- Weiss León 1996 "Histología". Ateneo 5ta edición, Argentina.