

TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Sr Luis Magan Perea
Técnico de microscopía electrónica
Servicio de Patología
Hospital del Mar. Barcelona

El físico Ernst Ruska (1906-1988) inventa y patenta en Berlín en año 1932 el microscopio electrónico, con lo cual revoluciona el mundo de la microscopía al conseguir incrementar 1000 veces el poder de resolución del microscopio óptico (0,2 micras) al del microscopio electrónico (1,4 Å). Este aumento se consigue al dejar de utilizar como fuente luminosa la longitud de onda de la luz visible que utiliza la microscopía óptica y utilizar partículas tan minúsculas como los electrones (microscopía electrónica). Este descubrimiento le valió al Dr Ruska que en el año 1986 se le otorgara el premio Nobel.

PAPEL DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

En la actualidad la microscopía electrónica (ME), tiene un papel importante en algunos tipos de patología como única arma diagnóstica, (enfermedades de carácter ultraestructural) aunque principalmente su valor es como técnica complementaria, que integrada con los datos de otros métodos diagnósticos (microscopía óptica, inmunohistoquímica, citogenética, biología molecular) son de ayuda para realizar un diagnóstico correcto.

A nivel de trabajos de investigación y como método empleado en la docencia la microscopía electrónica continua siendo hoy en día uno de los mejores métodos de estudio y el único que nos permite visualizar la ultraestructura celular y tisular.

DESCRIPCIÓN DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

Describiremos brevemente las partes principales del microscopio electrónico (ME) y el proceso de la obtención de la imagen. La fuente de iluminación del microscopio electrónico es un filamento que emite electrones (pistola de electrones) y se encuentra situado en la parte superior del microscopio. Estos electrones recorren su camino a través de una columna de dos metros de longitud, en la cual existen una serie de lentes magnéticas situadas a lo largo de la misma, estas irán corrigiendo el camino de los electrones. La primera es la lente objetivo, que concentra los electrones sobre la muestra, a su paso por la muestra, los electrones chocan con las estructuras del tejido, cambian de trayectoria y dejan de formar parte del haz de electrones que se corresponde con la imagen del tejido. Para que ello ocurra, impregnamos las células con soluciones metálicas (que hacen el papel de colorantes), estas sustancias frenan el paso de los electrones y provocan sombras que reproducen con precisión los detalles del interior de la célula. Los electrones no frenados por el metal depositado en las células siguen viajando por la

columna. El haz de electrones resultante atravesará dos lentes más, una intermedia y otra de proyección que amplificarán la imagen y la proyectarán sobre una pantalla fosforescente, permitiendo que sea visualizada por el observador.

ASPECTOS TÉCNICOS DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Las características de la muestra para poder ser observada con él ME, como son su grosor, resistencia a la acción de los electrones y conservación de los elementos celulares, hacen que el proceso de fijación, la inclusión, el corte y la tinción deberán realizarse de forma más precisa y delicada que los empleados en microscopía óptica.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras para estudio con ME, se obtienen directamente de tejidos sólidos o líquidos (material citológico o sangre), este proceso debe de realizarse en el menor tiempo posible entre la obtención de la muestra y su fijación, para evitar las alteraciones ultraestructurales celulares. Es importante evitar la desecación del tejido, el cual debe protegerse con gasas humedecidas en suero fisiológico, debe evitarse todo tipo de fuerza mecánica sobre el tejido (no presionar con las pinzas, dedos, instrumentos poco afilados), es conveniente utilizar hojas de bisturí o cuchillas completamente nuevas para cada toma. También podemos usar material incluido en parafina, realizando una nueva reinclusión, en los casos que no se tenga material incluido para ME, aunque la calidad de los resultados será inferior.

FIJACIÓN

Mediante el proceso de fijación lo que buscamos es obtener una excelente preservación ultraestructural de la muestra, de forma que los elementos celulares sean lo más parecidos posible a la realidad. Para ello es importante que el tejido se corte en fragmentos de 1 o 2 mm de grosor como máximo, para que los líquidos y las resinas penetren bien en los mismos.

La solución fijadora consiste en un agente fijador diluido en un tampón que reproduce mejor el medio natural de la muestra con un pH de 7 a 7,5. Los fijadores más frecuentes utilizados en ME son el glutaraldehído y el tetróxido de osmio.

La muestra una vez troceada, la fijamos en glutaraldehído al 1% entre 30 minutos y 24 horas, si se prolonga más tiempo puede alterar las estructuras del tejido. Después de la fijación la muestra la lavaremos mediante tampón cacodilato 0.2 M, dos veces de 10 minutos (cada una). Se realiza una postfijación con tetróxido de osmio al 2% durante 1h, una acción prolongada "quema" el tejido. El proceso de postfijación actúa como contraste y tinte parte de la célula, fundamentalmente las membranas y las estructuras lipídicas. Una vez realizada la postfijación volvemos a lavar con tampón cacodilato 0,2 M, dos veces de 10 minutos. En este tampón puede estar la muestra a 4° C por tiempo indefinido, hasta el proceso de inclusión.

SOLUCIONES

Glutaraldehido 2%

- ◆ 40 ml de glutaraldehido al 50 %.
- ◆ 960 ml de solución Buffer de cacodilato sódico al 0,2 M.

Tampón Cacodilato sódico 0.2 M (pH 7.4)

- ◆ 48 g cacodilato sódico.
- ◆ Enrasar hasta 1 litro de H₂O.

Solución madre de tetróxido de osmio al 2%

- ◆ 2 g de tetróxido de osmio (el osmio es altamente tóxico y cáustico, es necesario
- ◆ trabajar en campana de flujo, con guantes y lentes especiales)
- ◆ 100 ml de agua destilada (para su disolución el agua debe estar entre 90-95° C).

Nota: Los dos viales de tetróxido de osmio de 1 g se colocan sin romper dentro del agua caliente, lo que hace que el cristal se rompa, o bien lo rompemos con una barra de vidrio, luego agitamos con un agitador magnético hasta su total disolución.

Solución de trabajo de tetróxido de osmio

Se disuelven partesiguales de solución madre de tetróxido de osmio y solución tampón cacodilato 0,2 M (p. ej. 20 :20), esta solución se guarda en nevera

INCLUSION

El proceso de inclusión conserva indefinidamente el tejido fijado y nos permite trabajar con él de forma adecuada. La combinación de una consistencia elevada con una buena elasticidad permite obtener secciones extraordinariamente finas. Al principio de la ME, se hizo evidente que las parafinas eran un medio demasiado blando para obtener cortes finos y que resistieran además el bombardeo de los electrones, fue entonces, cuando se impulsó el desarrollo de los plásticos como medio de inclusión para ME.

La inclusión se inicia con el proceso de la deshidratación. Para que esta sea correcta debemos respetar los tiempos y evitar que la muestra se seque entre los pasos. Los

mejores contenedor es para realizar la inclusión son los de vidrio. El protocolo que nosotros seguimos es:

- ◆ Etanol de 96° 2 veces de 10 minutos
- ◆ Etanol de 100° 2 veces de 10 minutos
- ◆ Óxido de propileno 2 veces de 5 minutos

Para la inclusión hay muchas clases de resinas, las propiedades que deben poseer las resinas para ser un buen medio de inclusión son: tener gran poder de infiltración, una polimerización uniforme, un endurecimiento homogéneo, una buena elasticidad y una consistencia estable con el tiempo. Nosotros solemos emplear habitualmente resinas de tipo Epon.

Las resina EPON sólo es miscible con un solvente intermediario, (óxido de propileno o acetona), realizándose la inclusión de manera progresiva, de forma que aumentará la proporción de resina y disminuirá la del solvente hasta el 100% de resina.

La preparación de la resina EPON se realiza mezclando 4 componentes en una proporción conocida que es:

- ◆ EPON 812 50 g. (plastificante)
- ◆ DDSA (dodecemil succínico anhídrido) 32 g. (endurecedor)
- ◆ MNA (metil nadil anhídrido) 21 g. (endurecedor)
- ◆ DMP-30 (dimetilamino fenol) 2 g. (acelerador)

Para realizar la mezcla es mejor realizarla en dos soluciones la A con EPON 812 (13 g) i DDSA (32 g) i una solución B con EPON 812 (37g) i NMA (21 g). A la mezcla final, se añade el DMP-30, que activa la polimerización de la resina.

Protocolo de la inclusión en resina:

Para favorecer la penetración en el tejido, la resina se mezcla con óxido de propileno. La resina por si sola es muy densa y necesita la ayuda del óxido de propileno para penetrar en el tejido.

- ◆ Resina - óxido de propileno 25% durante 20 minutos
- ◆ Resina - óxido de propileno 50% durante 20 minutos
- ◆ Resina - óxido de propileno 75% durante 20 minutos
- ◆ Resina 100% durante 30 minutos
- ◆ Resina 100% durante 90 minutos

Los bloques se confeccionan en moldes de caucho, y se ponen en la estufa a 50° de 12 a 24 h. para su polimerización.

ULTRAMICROTOMIA

Los cortes son practicados mediante ultramicrotomo, con el cual conseguimos obtener unas secciones adecuadas para su posterior tratamiento y visualización. Muestras gruesas no pueden ser atravesadas por los electrones y, además, presentan superposición de estructuras y pérdida de detalle ultraestructural.

Tipos de cortes:

En M.E. existen dos tipos de cortes, los semifinos y los ultrafinos. Los cortes semifinos son de un grosor de 0,3 a 1 micras, se recogen en portaobjetos, se tiñen con azul de toluidina y se miran en el microscopio convencional. Estos cortes nos sirven de control para saber si en un bloque de tejido se encuentra el área que deseamos estudiar con el ME. Los cortes ultrafinos son de un grosor de 50 a 100 nm, se recogen en rejillas, se contrastan en soluciones metálicas y se miran con el microscopio electrónico. Este tipo de corte se usa para estudiar el tejido ultraestructuralmente.

Ultramicrotomo:

El ultramicrotomo difiere del microtomo convencional en algunos aspectos, como son el mecanismo del avance de la muestra que se hace por dilatación térmica del brazo del aparato. El sistema de cortes es automático (motorización). Lleva un sistema óptico (tipo lupa) acoplado con un aumento de entre 10X y 50X y con un sistema de iluminación adecuado. Un sistema de utillaje para colocar la cuchilla y el bloque, con aspirador de agua, para nivelar el baño de corte (baño donde se recogen los cortes).

Cuchillas:

Hay dos clases de cuchillas, unas que son de vidrio y otras de diamante. Para obtener las cuchillas, troceamos una barra de vidrio en trozos más pequeños de forma cuadrada, después volvemos a cortar esos cuadrados con un ángulo de 45° y así obtenemos cuchillas triangulares con filo. Para hacer esta operación disponemos de una máquina que corta con un diamante (L. K. B. Suecia). A estas cuchillas de vidrio, se les incorpora una bañera de plástico para recoger los cortes. Con estas cuchillas realizamos los cortes semifinos, aunque pueden servir también para cortes finos.

Las cuchillas de diamante perfeccionan los cortes, el filo es uniforme en toda su extensión y se utilizan para cortes ultrafinos. El diamante es un material muy duro, pero también es muy frágil si se golpea o no se manipula con mucho cuidado, por lo que este tipo de cuchillas, dado su alto coste, deben mantenerse y cuidarse adecuadamente.

Los bloques contienen un fragmento de tejido en uno de sus extremos. Antes de proceder al desvastado, debe reducirse la cantidad de resina que rodea a la pieza, esta operación se conoce como obtención de la pirámide. Una vez seleccionada la zona, debe practicarse sobre la pirámide, otra más pequeña y de menor altura, que contenga solo la zona de la que vamos a extraer los cortes ultrafinos.

Recogida de muestra:

Las secciones se recogen por flotación en la pequeña bañera adosada en la cuchilla llena de agua destilada. La apreciación del grosor del corte se hace por una escala de color, en la que los cortes más finos son los grises, plateados y dorados, por este orden. Los cortes semifinos se recogen en portaobjetos de vidrio mientras que los cortes ultrafinos se recogen en unas rejillas que tienen un enrejado metálico plano de 3 mm. de diámetro, el material del que están fabricadas es cobre y níquel.

TINCION

Con la tinción perseguimos obtener un contraste que nos permita ver bien la ultraestructura de la muestra, el objetivo es que el contraste metálico se deposite de manera selectiva y muy delicada sobre las estructuras celulares, para que se frene el paso de los electrones por ellas y se creen así sombras celulares muy detalladas.

La postfijación con tetróxido de osmio es el primer contraste que se efectúa en la muestra, tiñe las membranas celulares, las mitocondrias, y también los lípidos. Los cortes semifinos se tiñen con azul de toluidina al 1% y los cortes ultrafinos se tiñen con metales pesados.

Tinción de corte semifinos

AZUL DE TOLUIDINA (filtrar antes de uso)

- ◆ Tetraborato sódico al 1%
- ◆ Azul de toluidina al 1% (Añadir al tetraborato)
- ◆ Ajustar a pH 9,0

Los cortes se tiñen sobre placa termica.

Tinción de corte semifinos

La doble tinción se efectúa con acetato de uranilo al 6% y con citrato de plomo al 2%. El acetato de uranilo tiñe ácidos nucleicos y proteínas, mientras que el citrato de plomo tiñe ácidos nucleicos, ribosomas, membranas, glucógeno, proteínas y lípidos.

SOLUCION ACUOSA DE ACETATO DE URANILO al 6 %

- ◆ Acetato de uranilo ($\text{UO}_2, \text{CH}_3\text{O}_00)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 6 g
- ◆ Agua destilada 100 ml

La mezcla se agita en un agitador automático durante 30 minutos. Esta solución se puede guardar en reposo a temperatura ambiente en un recipiente completamente opaco y perfectamente cerrado, en estas condiciones la solución es estable entre tres y seis meses. Debe filtrarse antes de su uso.

SOLUCION DE CITRATO DE PLOMO DE REYNOLDS AL 2 %

- ◆ Nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) 1,33 g
- ◆ Citrato sódico ($\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 1,76 g
- ◆ Agua destilada sin CO_2 30 ml

(Para conseguir agua destilada libre de CO_2 , esta debe hervirse durante 10 minutos antes de su uso).

La mezcla debe agitarse continuamente de forma enérgica durante un minuto y de forma intermitente durante treinta minutos, la solución se considera terminada cuando aparece un aspecto lechoso y uniforme, entonces se añade 8 ml de hidróxido sódico 1N y se afora la solución hasta 50 ml con agua destilada, hasta que el citrato de plomo se disuelve por completo y se aclara la solución. El pH final es de 12 siendo estable en una botella cerrada durante seis meses. La solución debe centrifugarse y filtrarse antes de su uso y si aparecen precipitados debe rechazarse.

DOBLE TINCION DE LOS CORTES ULTRAFINOS EN LAS REJILLAS

TINCION CON ACETATO DE URANILO AL 6 %

Se colocan las rejillas en el porta rejillas especial para la tinción, se coje el acetato de uranilo del recipiente que esta en reposo, con una jeringa sin aguja y se coloca un filtro milipore (0,025 micras) a la salida de la jeringa, llenado el recipiente de tinción completamente, se coloca el porta rejillas con las rejillas a teñir durante 12 minutos. Debe tenerse la precaución de que no se evapore el líquido cerrando completamente el recipiente y que no incida la luz sobre la solución de uranilo. Una vez terminada la tinción se lava en agua bidestilada (tres cambios), puede dejarse en agua hasta la tinción con el citrato de plomo.

TINCION CON CITRATO DE PLOMO (REYNOLDS)

Se centrifuga el citrato de plomo que se vaya a utilizar, colocandolo en una jeringa nueva, evitando siempre el contacto con el sobrenadante que resulte de la centrifugación, se coloca a la salida de la jeringa un filtro milipore (0,025 micras). La solución se coloca en el recipiente de tinción hasta llenarlo totalmente, se coloca el portarejilla durante tres minutos. Inmediatamente sin dejar secar, se lava bien en agua bidestilada (tres pases), cuando no queden restos de plomo se secan las rejillas con papel de filtro. Estas rejillas se guardan en portarejillas adecuados para evitar la entrada de polvo, y ya son aptas para su visualización en el microscopio electrónico.

PROCEDIMIENTOS ESPECIALES EN ME

En algunos casos tenemos que procesar la muestra de manera especial como es el caso de los tejidos procedentes de parafina, material celular hematológico o en el caso de estudio de discinesias ciliares.

Tejido procedente de parafina:

El tejido procedente de parafina lo utilizamos en aquellos casos en que el estudio ultraestructural sea necesario para el diagnóstico y no tengamos material fijado e incluido para ME. Para ello marcaremos sobre el porta teñido con hematoxilina eosina la zona de interés del estudio y señalamos la zona que corresponde en el bloque de parafina, deshacemos el bloque de parafina (calor) y mediante un bisturi cortamos la pequeña/s zona para su posterior inclusión para ME.

Nosotros hemos diseñado una forma de coger las zonas para estudiar sin necesidad de deshacer el bloque de parafina. Esto lo conseguimos cogiendo las muestras con el aparato de confeccionar microarrays de tejidos utilizando aguja hueca de 1 mm, tras el marcaje de la zona a estudiar.

Los fragmentos de tejido provenientes de la parafina o los cilindros obtenidos mediante aguja de microarrays se desparafinan con xilol en la estufa a 50° durante 2 horas, posteriormente la muestra se hidrata mediante etanol de 100° durante 1 hora y etanol de 96° durante 1 hora, posteriormente se coloca en tampón de cacodilato durante 1 hora. A partir de entonces se procede con la postfijación con tetróxido de osmio siguiendo el protocolo de inclusión y tinción reseñado.

Material celular hematológico

La aplicación de la microscopia electrónica en las enfermedades hematológicas es importante en el diagnóstico de algunas de sus entidades. Para su estudio y dadas las características de la sangre, antes de su fijación deben de realizarse una serie de procedimientos para separar sus distintos tipos celulares.

Normalmente en el material hematológico se quiere estudiar los glóbulos blancos (leucocitos, monocitos) y las plaquetas para ello debemos concentrar el material, para conseguirlo, cogemos el tubo con la muestra y la diluimos al 50% en el tampón de Hanks (este tampón está comercializado). En un tubo se pone el 25% de líquido suspensorio (linfoprep, comercializado) y el 75% de sangre periférica o medular diluida y se centrifuga durante 20 minutos a 2000 rpm. El resultado es un anillo opaco separado entre el plasma y el líquido suspensorio, este anillo son los glóbulos blancos y plaquetas que tenemos que procesar. El anillo se pone en un tubo de vidrio de dilución con tampón de Hanks, y se centrifuga durante 10 minutos a 2500 rpm.

Se fijan las células con el 75% de tampón de Geys y el 25% de glutaraldehído al 2% durante 1 hora, se lava con tampón de cacodilato y se hace una postfijación con tetróxido de osmio durante 1 hora, posteriormente se lava con cacodilato y se pone en un tubo Eppendorf y se centrifuga 5 minutos a 10.000 rpm.

Finalizada la centrifugación, se corta la parte inferior del tubo de plástico a rodajas con un bisturí. Estas rodajas quedan constituidas de la siguiente manera: la parte externa es una arandela de plástico y la parte central es la formada por un botón celular, lista para la inclusión.

Material de estudio para discinesias ciliares

Existen enfermedades relacionadas con el mal funcionamiento de los cilios de los epitelios respiratorios, que condicionan una clínica de infecciones respiratorias de repetición en niños, por ello es importante descartar esta patología que sólo puede realizarse mediante su estudio con ME.

Los cilios son prolongaciones del citoplasma, rodeadas por membrana celular, que con su movimiento de barrido limpian las vías respiratorias de partículas indeseables, bacterias y moco. En su corte, localizamos nueve pares de túbulos en la periferia y un par central, este se relaciona con los pares periféricos mediante brazos radiales y estos pares periféricos se relacionan entre sí mediante las denominadas conexiones de nexina. De esta manera, estas estructuras provocan el movimiento de balanceo pendular esencial para la función ciliar.

En los cilios patológicos, hay pérdida de cantidades variables de brazos de dineína o radiales, los cilios se quedan estáticos y no hacen su función, que es la de batear la mucosidad, que queda quieta favoreciendo las infecciones y las crisis respiratorias en estos pacientes.

Protocolo del proceso de la muestra

La obtención de la muestra se realiza preferentemente de mucosa nasal profunda y en fase en la que no exista inflamación, esta se recoge con un cepillo de plástico y se sumerge en glutaraldehído al 2%. en un tubo de dilución y con una lanceta se procede a desprender las células del cepillo.

El material se centrifuga a 2.500 rpm. durante 10 minutos y se lava en tampón de cacodilato. Posteriormente se realiza una postfijación con tetróxido de osmio al 1 %. Se lava de nuevo con tampón de cacodilato y se pone la muestra en un tubo Eppendorf y se centrifuga a 10.000 rpm. durante 5 minutos. Una vez acabada la centrifugación, se corta el tubo a rodajas con un bisturí. Esto nos proporciona un botón celular listo para procesar.

PRODUCTOS PELIGROSOS QUE UTILIZAMOS EN ME

- ◆ **Glutaraldehído:** fija la piel, es tóxico y se cree que es carcinógeno
- ◆ **Cacodilato:** contiene arsénico que es venenoso y carcinógeno.
- ◆ **Tetróxido de osmio:** es tóxico por inhalación y puede producir quemaduras irreversibles en los ojos.
- ◆ **Etanol:** es volátil, tóxico e inflamable.
- ◆ **Óxido de propileno:** es volátil, tóxico, explosivo e inflamable.
- ◆ **Resinas:** pueden dar alergias en contacto con la piel y se cree que son carcinógenas.

Por todo ello es conveniente tomar medidas de seguridad en la manipulación de estos productos (es obligatorio trabajar bajo campana, con guantes, mascarilla y protección ocular), ser limpios y cuidadosos con la técnica y seguir las normas de recogida y tratamiento de residuos de productos peligrosos.

APLICACIONES DIAGNÓSTICAS DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN PATOLOGÍA

Dra. Nuria Juanpere Rodero

Servicio de Patología, Hospital del Mar, Barcelona

XXVI Congreso Nacional de la SEAP-IAP, XXI Congreso Nacional SEC, II Congreso Nacional de la SEPAF



INTRODUCCIÓN

La posibilidad de modular el paso de haces de electrones a través de campos magnéticos dio lugar a los primeros microscopios electrónicos. El microscopio electrónico fue desarrollado por Ruska y colaboradores en Alemania, entre 1931 y 1933. Fue comercializado por primera vez por Siemens en 1939 y desde entonces ha experimentado múltiples mejoras técnicas. La introducción del microscopio electrónico abrió vastas fronteras en el campo de la morfología y contribuyó de forma fundamental al conocimiento de la estructura celular y tisular.

A pesar de que la microscopía electrónica tradicionalmente se ha aplicado más en biología celular que en el diagnóstico, y que en la actualidad se emplea más en investigación, en muchos centros sigue utilizándose como herramienta complementaria al microscopio óptico para resolver problemas diagnósticos.

Si bien el aumento de tamaño de la imagen es una parte importante de la función del microscopio electrónico, no sería útil si no fuera acompañado de la posibilidad de discriminar con más precisión diferentes estructuras en el tejido. Esto constituye el denominado poder de resolución y se refiere como la distancia más pequeña a la que pueden encontrarse dos partículas para ser

observadas como estructuras diferentes y no como una sola. El desarrollo tecnológico del microscopio electrónico permitió incrementar el poder de resolución en unas mil veces respecto al microscopio óptico (de 0,2 μm a 0,2 nm).

La aplicación del microscopio electrónico en el campo de la Patología se impuso a partir de 1960. Hasta ese momento, los tejidos y células se estudiaban con microscopios ópticos o con alguna de sus variedades (de luz polarizada, de contraste de fases, de campo oscuro o de fluorescencia), mediante métodos de tinción convencionales o tinciones especiales para diferentes componentes celulares o extracelulares, incluyendo técnicas de histoquímica. Cuando el microscopio electrónico y las técnicas específicas de procesamiento de muestras se fueron perfeccionando, se hizo evidente que el microscopio electrónico podía permitir profundizar en el conocimiento de las células y tejidos, tanto normales como patológicos. En muchos casos, se trataba simplemente de identificar el sustrato ultraestructural de las imágenes del microscopio óptico, pero en muchos otros se vio que la microscopía electrónica aportaba información que podía ayudar a entender mecanismos fisiopatológicos y a hacer diagnósticos mucho más precisos.

Durante dos décadas, esta era la técnica complementaria final de la que disponía el patólogo para resolver problemas diagnósticos. La irrupción de la inmunohistoquímica supuso un cambio radical en el uso del microscopio electrónico porque, a diferencia de éste, podía ponerse en práctica en cualquier laboratorio con una infraestructura relativamente sencilla y sin que a priori hubiera un entrenamiento específico. Aunque estas ventajas han sido matizadas por la experiencia, lo cierto es que por razones de tipo práctico la inmunohistoquímica es la técnica auxiliar de primera línea y el microscopio electrónico ocupa una segunda línea en el frente de las armas diagnósticas.

LIMITACIONES Y VENTAJAS DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

A pesar de la gran cantidad de datos que proporciona, la microscopía electrónica no puede sustituir la información que se obtiene con la microscopía óptica convencional. Con esta técnica elemental se pueden hacer la mayor parte de los diagnósticos. En cambio, dos de las principales limitaciones de la

microscopía electrónica son que no permite reconocer si una célula pertenece o no a un tumor y, en caso de saber que pertenece, no permite decidir si se trata de un tumor benigno o maligno.

Las aplicaciones de la microscopía electrónica tienen que ver con su poder de resolución y por tanto se podrán observar con facilidad las organelas y otras estructuras muy pequeñas dentro de las células o en el medio extracelular. Esto es especialmente útil cuando son estructuras que caracterizan una determinada enfermedad y cuando se encuentran en pequeñas cantidades pero dispersas por el tejido. La inmunohistoquímica proporciona una información cualitativa (positividad) y cuantitativa (intensidad) sólo sobre aquellas estructuras o sustancias (antígenos) que buscamos, mientras que la microscopía electrónica da detalles tanto cualitativos como cuantitativos muy completos sobre todos los componentes celulares. Por lo tanto, se puede hacer un estudio de microscopía electrónica sin tener una idea preconcebida sobre lo que esperamos encontrar. Lo que a veces la inmunohistoquímica resuelve con baterías muy largas de anticuerpos, la microscopía electrónica puede resolverlo mediante un solo procedimiento técnico.

En general, se considera que un 3% de las biopsias que se estudian en un hospital de tipo general pueden beneficiarse de la microscopía electrónica de una forma u otra. La microscopía electrónica está especialmente indicada en dos grandes grupos de procesos: los tumores y las enfermedades no tumorales (renales, ciliares, neurológicas, metabólicas, cutáneas y microbiológicas).

A continuación se revisan las aplicaciones más importantes que tiene hoy en día la microscopía electrónica en el diagnóstico patológico.

APLICACIÓN DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN EL DIAGNÓSTICO

Enfermedades renales

La Nefrología, en especial, es una de las ramas de la Medicina en las que el microscopio electrónico se ha empleado de forma más constante desde sus inicios para la evaluación diagnóstica. El microscopio electrónico jugó un

papel decisivo en la definición de la patología del glomérulo renal, debido a que permitía observar con facilidad alteraciones morfológicas de difícil visualización con el microscopio óptico.

Una gran parte de las enfermedades nefrológicas son las llamadas glomerulonefritis y tienen lugar en el glomérulo, la estructura donde se filtra la sangre y dónde empieza la producción y el procesamiento de la orina. Se trata de una estructura formada por ovillos de capilares centrados por un eje de células y matriz llamado mesangio y rodeados por unas células epiteliales especiales, los podocitos. Las alteraciones finas de la morfología de los glomérulos son difíciles de apreciar en el microscopio óptico. Además, en muchas glomerulonefritis se depositan inmunocomplejos con localizaciones y aspectos diferentes según la enfermedad. Por este motivo, a menudo resulta de gran utilidad confirmar los hallazgos ópticos con el microscopio electrónico o bien aclararlos cuando sean de interpretación complicada. Además, en fases iniciales es posible que las glomerulonefritis sólo se puedan diagnosticar mediante microscopía electrónica. Finalmente, existen enfermedades glomerulares en las que su empleo sigue siendo obligado y, en muchas ocasiones, es el único medio de diagnóstico, tales como las enfermedades de la membrana basal del glomérulo o la nefropatía de cambios mínimos.

Esta es una de las aplicaciones más importantes y frecuentes de la microscopía electrónica. En algunos centros se considera imprescindible hacer el estudio ultraestructural en la mayor parte de biopsias renales de manera sistemática.

Enfermedades ciliares

Los cilios son especializaciones de la membrana apical de las células epiteliales, que tienen como misión mover las secreciones de la superficie de estas células. Se encuentran principalmente en el epitelio bronquial y tubárico. En el primero, su acción permite limpiar las vías aéreas de moco y de las partículas y microorganismos que quedan adheridos. En la trompa uterina, propulsan el óvulo en dirección a la cavidad del útero. Así pues, son móviles y su movimiento se debe a que tienen una estructura interna formada por nueve pares de túbulos periféricos y un par de túbulos centrales, unidos entre sí por

una serie de proteínas. Una de ellas, la dineína, es la responsable del desplazamiento de unos pares de túbulos sobre los demás y por tanto del movimiento pendular del cilio.

La acción del tabaco y de la contaminación, las infecciones repetidas o defectos congénitos en alguna de las proteínas constituyentes (especialmente los llamados brazos de dineína) tienen como consecuencia la pérdida total o parcial de la movilidad de los cilios, o discinesia ciliar. A su vez, cuando los cilios no se mueven se producen infecciones respiratorias que alteran aún más la estructura del cilio. Las alteraciones congénitas más graves se asocian a variaciones en la posición del corazón (síndrome de Kartagener). Además, las alteraciones primarias se asocian a esterilidad, tanto femenina (por alteración de los cilios tubáricos) como masculina (por afectación de los flagelos de los espermatozoides).

La única manera de estudiar los cilios es mediante microscopía electrónica. Para saber si la alteración de la motilidad ciliar es primaria o congénita, se evalúan alrededor de 50 cilios cortados de manera perpendicular y se cuenta la cantidad de brazos de dineína. Si hay una proporción baja (inferior al 40%), se puede considerar que los cilios son el problema primario y que las infecciones son la consecuencia y no la causa. De esta manera, aunque no hay un tratamiento específico, se pueden dar medidas de apoyo a los enfermos y se pueden ahorrar otras exploraciones más cruentas. Esta es otra de las situaciones en las que el uso del microscopio electrónico se está incrementando de forma notable.

Enfermedades neurológicas

En este campo, las aplicaciones de la microscopía electrónica se centran en el sistema nervioso periférico y en el músculo. Respecto a la biopsia de nervio periférico, el interés fundamental suele ser evaluar la proporción y el aspecto de las fibras con vaina de mielina y de las que no la tienen (fibras amielínicas). En ocasiones, la única manera de determinar si el problema del nervio se debe a una alteración de la vaina de mielina o del axón propiamente dicho será la evaluación ultraestructural.

Más frecuente es que haya completar los estudios de microscopía óptica convencional y de histoquímica enzimática del músculo con el estudio de microscopía electrónica. Diversas alteraciones del músculo son visibles más fácilmente o exclusivamente con el microscopio electrónico. Así, pueden encontrarse acúmulos anormales de proteínas filamentosas en el núcleo o en el citoplasma que definen diferentes tipos de miopatías (miopatía oculofaríngea, miositis con cuerpos de inclusión, miopatías fibrilares). O bien alteraciones en la posición de los componentes contráctiles del músculo (miopatías " central core "o" mini core ") o alteraciones en las mitocondrias (miopatías mitocondriales). A veces los hallazgos ultraestructurales son la clave del diagnóstico, otras veces hay que ponerlos en el contexto de alteraciones clínicas o bioquímicas o de los hallazgos del estudio convencional con microscopía óptica.

Enfermedades metabólicas

Las llamadas enfermedades lisosomales se caracterizan por defectos congénitos en alguno de los enzimas que participan en diferentes procesos bioquímicos. Muchas veces, estos defectos suponen que el producto que debían procesar las enzimas se acumule de manera anormal dentro de lisosomas. El aspecto ultraestructural de estos acúmulos es con frecuencia característico o diagnóstico, pero en otras ocasiones habrá que complementar el estudio de microscopía electrónica con pruebas bioquímicas que en general son mucho más específicas. Hoy en día, la microscopía electrónica se aplica sólo en casos seleccionados en los que se prevé que la sustancia que se acumule sea característica (por ejemplo, la enfermedad de Gaucher o la enfermedad de Fabry).

Enfermedades de la piel

La aplicación de la microscopía electrónica en el análisis del tejido cutáneo se hacía muchas veces para estudiar enfermedades generalizadas (enfermedades metabólicas, enfermedades del colágeno) o enfermedades del epitelio escamoso (ictiosis). Pero quizás la aplicación más específica y más

frecuente en la actualidad es el esclarecimiento de las enfermedades ampollosas de la piel (epidermolisis ampollosas o bullosas), que se caracterizan por una gran facilidad de separación entre la epidermis y la dermis. Dependiendo del lugar en el que se produzca esta separación hay distintas variedades, algunas de ellas con muy mal pronóstico. La microscopía electrónica es decisiva para aclarar con precisión el punto de ruptura entre la epidermis y la dermis y así clasificar la lesión. Existen tres grandes grupos de enfermedades ampollosas:

- Epidermolisis epidermolítica: ruptura por lisis de los queratinocitos de la capa basal.
- Epidermolisis atrófica: ruptura por debajo de los queratinocitos y por encima de la membrana basal.
- Epidermolisis distrófica: ruptura por debajo de la membrana basal, entre ésta y el tejido conectivo de la dermis subyacente.

Identificación de microorganismos

Los microorganismos que podemos identificar con la ayuda de la microscopía electrónica son sobre todo de tipo vírico. Las características ultraestructurales de los virus y sus partículas permiten una clasificación bastante precisa. Si las partículas víricas son abundantes, algunos tipos de virus pueden identificarse por inmunohistoquímica (herpes, citomegalovirus, papiloma, etc). Con la microscopía electrónica, podremos identificar partículas de todo tipo de virus, con formas y agregaciones muy diversas, incluso si son escasas. Sin embargo, hay partículas que se pueden confundir con virus y es necesario que el microscopista electrónico esté familiarizado con ellas para evitar errores.

Los protozoos pueden observarse mediante microscopía óptica, a menudo con el objetivo de inmersión en aceite. Hay situaciones en las que se encuentran mezclados con tejido necrótico o elementos inflamatorios y la observación óptica es difícil. Puede ser muy útil confirmar la presencia de estos microorganismos por microscopía electrónica. Además, el estudio ultraestructural permite su clasificación de forma más precisa e incluso la identificación de diferentes fases del ciclo vital del parásito. Los protozoos con

los que esto ocurre más a menudo son la Leishmania, el Toxoplasma, el Cryptosporidium, el Microsporidium y la Isospora.

La identificación de bacterias por microscopía electrónica está indicada en situaciones muy concretas: la enfermedad de Whipple, en la que se acumulan bacilos en el interior de macrófagos de la lámina propia intestinal y en otras localizaciones, la espiroquetosis intestinal, proceso asociado en ocasiones a infección por VIH, y la angiomatosis bacilar, también relacionada con el VIH y que es importante reconocer puesto que se puede confundir con un tumor vascular maligno asociado al SIDA (sarcoma de Kaposi).

El interés de la microscopía electrónica en el estudio de los hongos y los helmintos es mucho menor.

Tumores

Como ya se ha mencionado, la microscopía electrónica no permite distinguir entre células tumorales y no tumorales, ni entre tumores benignos y malignos. Todo esto debe hacerse por microscopía óptica. Pero la microscopía electrónica sí puede ser una técnica complementaria muy útil en el estudio de los tumores, combinada con la inmunohistoquímica. Las células tumorales intentan generalmente reproducir las características morfológicas de las células normales del mismo tejido, en lo que se denomina diferenciación. Ésta es una de las características que se utilizan para clasificar las neoplasias en diferentes grupos (epiteliales, conectivas, óseas, etc), que a menudo tienen comportamientos clínicos distintos. Además de la evaluación cualitativa de la diferenciación también se hace una valoración cuantitativa, generalmente en tres grupos: tumores bien diferenciados (cuando se parecen mucho a su contrapartida normal), moderadamente diferenciados (cuando se parecen pero sólo en parte) y mal diferenciados (cuando se hace difícil deducir la contrapartida normal a partir de su apariencia).

Las situaciones generales en las que la microscopía electrónica será más útil en el estudio de un tumor son las siguientes (listadas por orden de frecuencia en que se plantean):

- Se han agotado los recursos de la inmunohistoquímica y de otras técnicas y no se ha resuelto el caso. Generalmente, se saca menos rendimiento de esta aplicación que de las otras.
- La inmunohistoquímica ofrece resultados contradictorios (por ejemplo, presencia de anticuerpos epiteliales y conectivos en una misma célula).
- El abanico de posibilidades diagnósticas es tan grande que habría que hacer una batería inmunohistoquímica demasiado larga. En algunos centros, si fuera necesario analizar 6 o más anticuerpos, se explora antes el rendimiento de la microscopía electrónica y la orientación diagnóstica que se derive de su aplicación.
- Del conjunto de anticuerpos estudiados, sólo se demuestra expresión de uno. Esto es especialmente frecuente en tumores de los tejidos blandos y en concreto con los anticuerpos para vimentina y proteína S100.
- La inmunohistoquímica ha resultado negativa porque la estructura diagnóstica es demasiado pequeña y escasa para que pueda detectarse con el microscopio óptico, aunque se haya teñido.
- El caso está diagnosticado y resuelto con inmunohistoquímica, pero queremos hacer un control de calidad con otra técnica complementaria.

Las diferentes combinaciones de organelas permiten clasificar los tumores sin mucha dificultad, excepto en los casos peor diferenciados. A continuación, se resume en la tabla 1 algunas de las organelas que caracterizan los diferentes tipos de tumores.

BIBLIOGRAFÍA

Biel SS, Gelderblom HR. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *J Clin Virol* 1999; 13:105-119.

Introduction to Diagnostic Electron Microscopy. Bruce Mackay. Appleton-Century-Crofts. New York. 1981.

Lloreta J. La apariencia óptica de las células y los tejidos patológicos desentrañada a través del microscopio electrónico. Bases ultraestructurales de la microscopía óptica. *Rev Esp Patol* 2008; 41:11-22.

Rosai J. Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology. *Lab Invest* 2007; 87:403-408.

Tabla 1.

Microvellosidades	Diferenciación glandular
Microvellosidades cortas	Gastrointestinal
Microvellosidades largas	Mesotelioma
Luces glandulares	Diferenciación glandular
Desmosomas	Diferenciación epitelial (carcinomas), sarcoma sinovial, sarcoma epiteliode, meningioma
Mitocondrias	Tumores oncocíticos renales
Tonofilamentos (queratina)	Carcinoma escamoso
Cuerpos de Weibel-Palade	Tumores vasculares diferenciados, vasos normales en tumores
Vacuolas de grasa sin membrana	Tumores adiposos
Vesículas	Diferenciación neuronal o neuroendocrina
Gránulos	Secreción de diversa índole, identificable por la morfología del gránulo
Filamentos de miosina	Tumores musculares
Retículo rugoso	Diferenciación glandular, células plasmáticas, neurohipófisis
Melanosomas	Tumores pigmentados (melanoma)
Glucógeno	Tumores de células claras