

TRABAJOS ORIGINALES

Cátedra de Histología, Embriología General y Anatomía Patológica.

Universidad de Cádiz. Facultad de Medicina.

Complejo asistencial Médico-Quirúrgico «San Rafael». Cádiz. Departamento de Anatomía Patológica.

La microscopia electrónica de barrido en el carcinoma de vesícula biliar

Por los Dres. A. LOPEZ*, J. VILCHES**, R. BENVENUTY*** y S. GOMEZ****

RESUMEN

El examen con microscopia electrónica de barrido de distintas regiones de vesículas biliares neoplásicas permite observar diferentes cuadros lesionales según su topografía. Las áreas no tumorales muestran cambios morfoestructurales idénticos a los observados en las colecistitis. Las zonas marginales ofrecen cambios hiperplásicos caracterizados, fundamentalmente, por modificaciones en cuanto a la distribución y disposición de los microvilli, mientras que las áreas propiamente tumorales muestran desorganización de la arquitectura del órgano, desaparecen los pliegues clásicos de la mucosa que son sustituidos por áreas mamelonadas. Dichas áreas se encuentran revestidas por células altamente pleomórficas cuya superficie celular, muy accidentada, muestra junto a paquetes de microvilli sumamente alterados y penachos de gran longitud, áreas cerebriformes desprovistas de diferenciaciones.

SUMMARY

The examination with sweeping electronic microscopy of different regions of neoplastic gall bladders allows to observe different lesional pictures depending on its topography. The non tumoural areas show identical morphoestructural changes to those observed in cholecystitis. The marginal areas show hiperplasic changes, characterized, mainly, by modifications concerned with the distribution and disposition of the microvillis, while in the tumoural areas show desorganization of the organ architecture, the classic mucosa foldings disappear which are substituted by mamelonad areas. Such areas are revested by highly pleomorphic cells whose celular surface, very accidental, shows together with parcels of highly modified microvillis and tufts of a great length, brainshaped areas without any differentiation.

INTRODUCCION

Los estudios de los caracteres morfoestructurales de las vesículas biliares humanas en condiciones normales y patológicas, son hasta el presente, menos frecuentes que en los animales de experimentación (MYLLARNIEMI) (11). En este sentido, los trabajos con microscopia electrónica de barrido, que constituye un instrumento útil en el análisis de las superficies celulares, son muy escasos.

La membrana celular responde a la lesión modificando sus caracteres —alteraciones de los microvilli, ciliogénesis, protrusiones, etc.— que son la consecuen-

cia de los cambios de la función celular (TRUMP) (20). En la actualidad, es muy difícil evaluar y diferenciar las alteraciones de la superficie celular en las células neoplásicas de aquéllas que son la expresión de la respuesta a múltiples modificaciones del micromedioambiente y que no implican la transformación neoplásica (NICOLSON) (12, 13). Sin embargo, el estudio de los caracteres de la membrana plasmática puede aportar datos importantes que ayuden en el diagnóstico y pronóstico de ciertas neoplasias así como en la diferenciación de estadios hiperplásicos, preneoplásicos y tumorales de una determinada población celular. En trabajos previos, hemos estudiado mediante microscopia electrónica de barrido, las vesículas litiasicas en orden, entre otros objetivos, a establecer parámetros comparativos con células malignas de los carcinomas de la vesícula biliar objeto del presente trabajo.

* Profesor Titular.

** Profesor Titular.

*** Servicio de Cirugía.

**** Profesor Ayudante.

MATERIAL Y METODOS

Se han empleado cinco vesículas, que fueron obtenidas en el transcurso de colecistectomías por neoplasia biliar. Inmediatamente después de su extracción se introdujeron en suero salino a temperatura ambiente y una vez removida la bilis y posible contaminación, se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato durante un período de 24 a 48 horas. En ningún caso, y de acuerdo con HOPWOOD (7) y WILLIAMS (22), se sobrepasó de los quince minutos desde la extirpación hasta su inmersión en el fijador.

Tras la fijación y una vez en el tampón, se procedió al tallaje de las mismas obteniéndose pequeñas muestras de áreas exentas de tumor, peritumorales y propiamente neoplásicas que se procesaron tanto para microscopia óptica, para su comprobación histológica, como para microscopia electrónica de barrido. Para estas últimas, se utilizó el método de MURAKAMI (10) del ácido tánico-tetraóxido de osmio; se deshidrataron en acetona y posteriormente se sometieron a punto crítico usando CO_2 líquido. Los especímenes se observaron tras el recubrimiento con oro paladio, en un microscopio electrónico de barrido Philips 501.

RESULTADOS

El examen con microscopia electrónica de barrido de la mucosa de las vesículas biliares neoplásicas, en

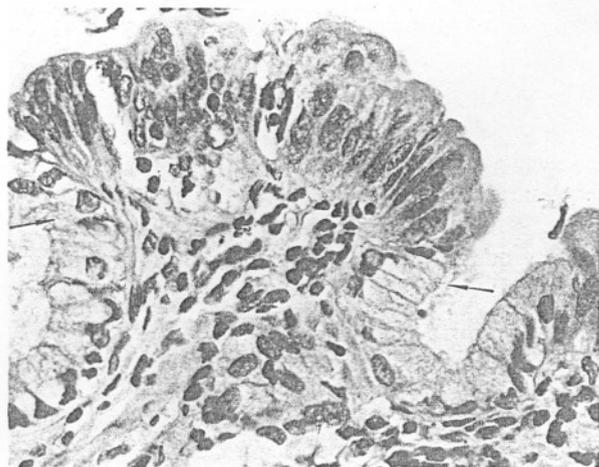


FIG. 1.—Imagen óptica de los vértices de los pliegues. Se observa un campo de hiperplasia atípica con pseudoestratificación, pérdida de la polaridad celular y atipia. Existen áreas de mucosa «normal» (↖). Esta región pertenece a zonas periféricas donde macroscópicamente no era evidente la neoformación.

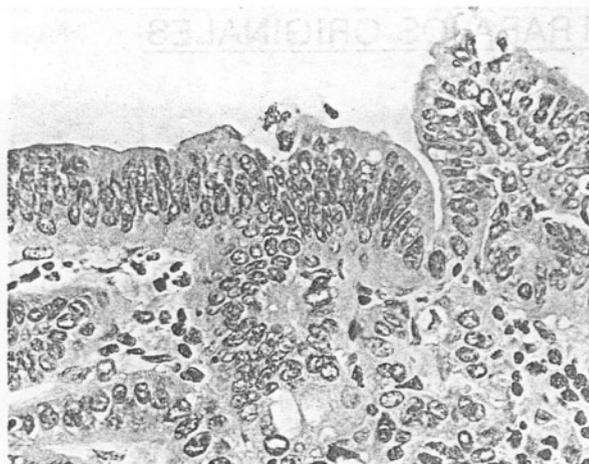


FIG. 2.—Elementos marcadamente atípicos multiseriados que se extienden en los pliegues mucosos. Esta imagen óptica ha sido tomada de muestras periféricas a la neoformación macroscópica.

regiones alejadas, exentas de tumor, muestra pliegues aplanados y engrosados, algunos de los cuales ofrecen pequeñas soluciones de continuidad de su epitelio

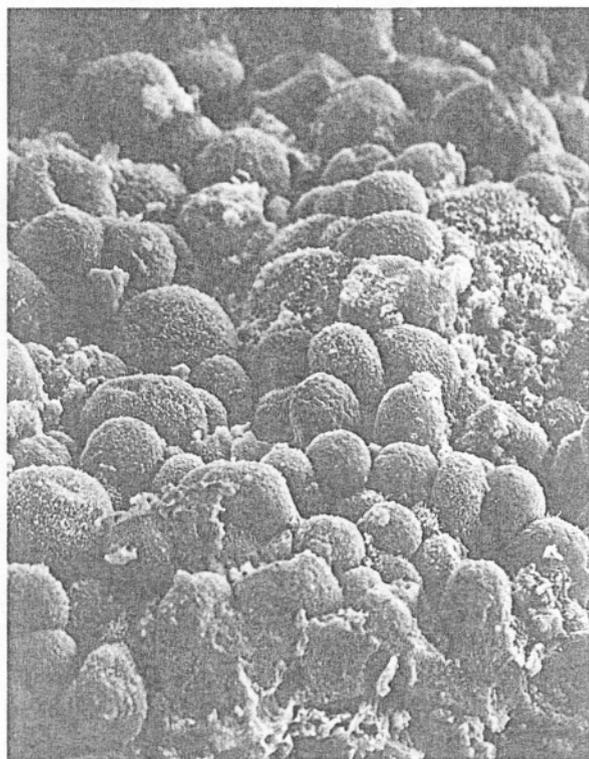


FIG. 3.—Área de «transición» con células de diferente tamaño y en distintos planos (x 1.250).



FIG. 4.—Area de transición a mayor aumento. Las células muestran microvellosidades cortas. Junto a éstas, no es raro encontrar otras células con escasos microvilli y superficie cerebriforme (*). (x 5.000).

columnar. Dichos pliegues, a mayor aumento, aparecen revestidos por elementos prismáticos, de idéntica altura, contorno poliédrico y polo apical cupuliforme con numerosos microvilli de longitud y dirección semejantes.

En zonas periféricas al tumor desaparecen los pliegues tan característicos de dicha mucosa siendo sustituidos por placas discretamente onduladas que se continúan sin límites precisos con áreas mamelonadas tumorales (figuras 1, 2 y 3). Dichas placas se encuentran cubiertas por elementos epiteliales que

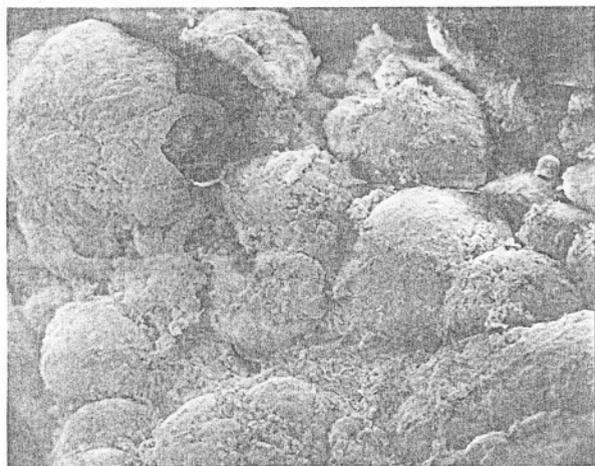


FIG. 5.—Superficie de la mucosa biliar neoplásica. Los pliegues característicos han sido sustituidos por mamelones de disposición irregular (x 80).

alcanzan diferentes alturas y que conservan, en su mayoría, una morfología poliédrica y una superficie apical cupuliforme con numerosos microvilli que, en ocasiones, sólo ocupan ciertas áreas celulares, existiendo asimismo, una gran variabilidad en cuanto a su longitud. Alternando con estas células se observan otras exentas o con muy escasos microvilli que ofrecen una superficie cerebriforme con micróplicas y protrusiones (figura, 4). Existe igualmente un material globular que ocupa, preferentemente, la periferia celular rellenando las hendiduras intercelulares.

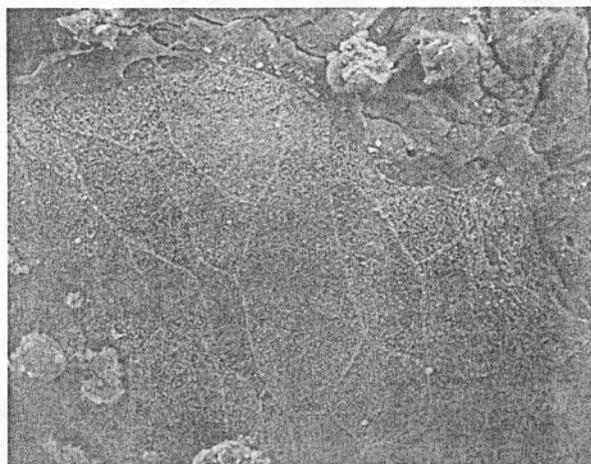


FIG. 6.—Células neoplásicas, poligonales que ofrecen superficie plana y límites netos. El pleomorfismo celular es muy evidente (x 1.250).

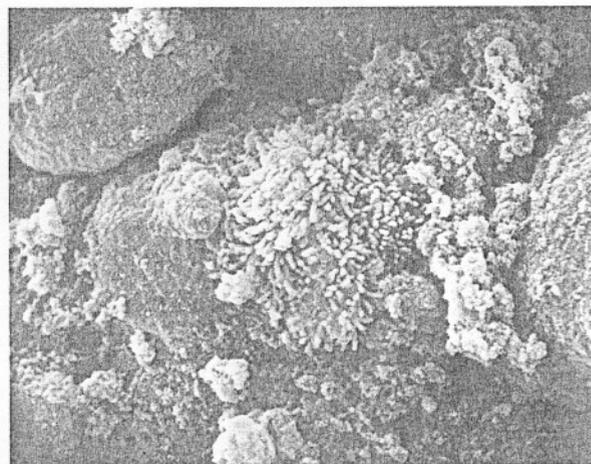


FIG. 7.—Elemento neoplásico que muestra una porción de su superficie apical lisa y microvilli pleomórficos en un extremo. Se observan, igualmente, restos de aspecto morular en los espacios intercelulares (x 5.000).

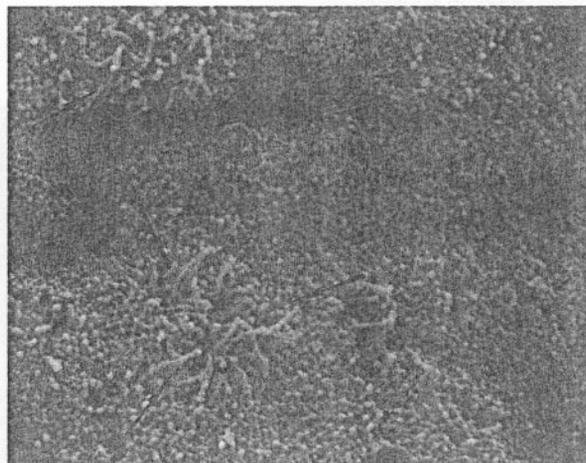
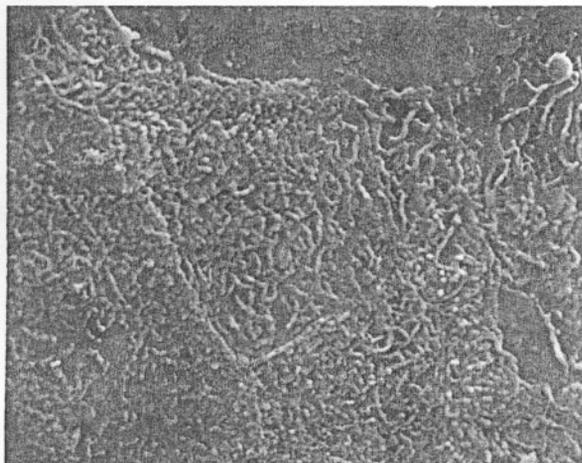


FIG. 8 y 9.—Microvilli de diferentes longitudes, irregulares y pleomórficos en células neoplásicas. Algunos de ellos se agrupan en forma de penacho (*). (x 5.500).

Las áreas propiamente neoplásicas, a bajos aumentos, se encuentran integradas por mamelones de alturas y diámetros diferentes con superficies lumbinales discretamente aplanadas (figura, 5). Entre dichos mamelones existen profundas hendiduras ocupadas parcialmente por un material de aspecto coraliforme. A mayores aumentos observamos cómo sus superficies están revestidas por células asiento de anisocitosis y anisomorfía marcada (figura, 6). Los límites intercelulares son, en determinadas áreas, muy manifiestos (figuras, 6 y 8) y su polo apical se encuentra aplanado mostrando numerosos microvilli que ofrecen diferentes longitudes y pierden la orientación que mantenían en las áreas no neoplásicas lo que les da un aspecto más abigarrado (figuras 7 y 8). En algunas células alcanzan una longitud considerable constituyendo auténticos penachos (figuras 8 y 9). Junto a estas áreas existen otras donde las uniones intercelulares no son tan llamativas y aparte de las células descritas con numerosos microvillis se observan otras con un número muy reducido, microplicas y superficie cerebriforme (figura 7).

En ninguno de los casos examinados hemos observado fenómenos de carácter secretor.

DISCUSION

Aunque, en la actualidad, existe un cierto número de estudios realizados con SEM de superficies epiteliales preneoplásicas y neoplásicas, resulta muy difícil

establecer modificaciones de la superficie celular que sean patognomónicamente neoplásicas y diferenciarlas de aquéllas que responden a cuadros lesionales no neoplásicos. Dichos estudios se han llevado a cabo sobre mucosa cólica (PHELPS) (14), (SIEW) (17); urotelio (TANNENBAUM) (19), (HODGES) (6); mucosa uterina y cervical (KENEMANS) (8). No hemos encontrado, en la bibliografía consultada, estudios con SEM de la mucosa biliar neoplásica y solamente WILLIAMS (22), en un trabajo dedicado a colecistitis, recoge algunas imágenes de barrido sobre el carcinoma biliar.

Las distintas características topográficas de la mucosa biliar observada en el presente estudio, se correlacionan perfectamente con el examen con microscopía óptica de secciones de parafina de lugares semejantes. Las zonas exentas de tumor mostraban cambios inflamatorios y las imágenes ultraestructurales de barrido eran idénticas a las descritas en nuestro trabajo previo (LOPEZ) (9).

La mucosa adyacente a la neoplasia, desde el punto de vista óptico, se caracterizaba por la presencia de distipias, hiper Cromatismo y estratificación celular, que se corresponden con los cuadros hiperplásicos e hiperplásicos atípicos descritos por ALBORES-SAAVEDRA (1) y BLACK (2). Estos cambios ocurren, preferentemente, en el vértice del pliegue mucoso y de ahí se extienden hacia las vertientes laterales, adoptando una topografía lesional semejante a la observada en las colecistitis (WILLIAMS) (22), (SCHAFF) (18), y pueden explicarse por las mismas teorías clásicas de la irritación litiasica. Las imágenes con SEM muestran placas onduladas que se continúan sin límites precisos con las áreas mamelo-

nadas tumorales. Las superficies celulares, aunque con cambios, siguen manteniendo una serie de estructuras que aparecen, tanto en condiciones normales como en cuadros lesivos de tipo inflamatorio (REPASSY) (16), (LOPEZ) (9), lo que nos induce a pensar que conservan aún cierto grado de diferenciación y mantienen la polaridad celular. Sin embargo, al igual que ocurre con los cambios hiperplásicos en el epitelio vesical (HODGES) (6), las diferenciaciones microvillositarias de la membrana plasmática ocupan sólo ciertas áreas celulares y existe una mayor variabilidad con respecto a su longitud. Junto a estas células, empiezan a aparecer otras con escasos microvilli y superficie cerebriforme.

Las áreas propiamente neoplásicas muestran una arquitectura diferente a las anteriormente estudiadas —los pliegues son sustituidos por formaciones mameionadas— y sus células ofrecen microvilli pleomórficos sumamente característicos que nosotros no hemos observado en las vesículas litiásicas con colecistitis (LOPEZ) (9), ni en regiones no tumorales de las vesículas neoplásicas.

En las distintas poblaciones celulares el complejo superficie celular —envoltura celular o glicocalix y membrana plasmática— es de suma importancia en el comportamiento de dichas células (KENEMANS) (8). Se conocen modificaciones de la superficie celular de gran interés diagnóstico y terapéutico; GAHMBERG (3) ha estudiado las modificaciones que sufre el modelo glicoproteico de la envoltura celular en los glóbulos blancos tras su activación o inducción de diferenciación y comprueba que los glóbulos neoplásicos poseen una composición glicoproteica diferente a la de los sanos. Existen otras observaciones que implican a las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular en la regulación de fenómenos biológicos tales como la morfogénesis y la transformación neoplásica (HENDRIX) (4), (HICKS) (5). Por tanto, las modificaciones de la superficie celular se reflejan mediante cambios detectables, bien desde el punto de vista estructural (topografía de esa superficie) o funcional (receptores de membrana, lugares antigénicos, etc.).

La presencia de microvilli anómalos y pleomórficos ha sido reseñada en diversas neoplasias estudiadas mediante SEM; SENEMANS (8) las encuentra en las células cervicales uterinas neoplásicas; TANNENBAUM (19) las observa en carcinomas transicionales al igual que HODGES (6) y ambos concluyen que estas modificaciones sólo aparecen en estados neoplásicos y no en células normales o hiperplásicas. PORTER (15) y VESELY

(21) justifican estos cambios por el incremento de actividad de superficie en los elementos neoplásicos.

Por otro lado, observamos cómo los espacios intercelulares, en algunos campos, son más amplios, y debe ser como consecuencia de la falta de adhesividad existente en las células neoplásicas. KENEMANS (8) observa una marcada disminución del número de desmosomas en las células cervicales neoplásicas.

El estudio pues, con SEM, de la superficie celular, nos proporciona una información útil sobre el estado funcional de la célula revelándonos modificaciones propiamente neoplásicas. Sin embargo, no existe una línea de demarcación neta entre las células neoplásicas y las no tumorales en las misma vesícula.

Correspondencia:

A. López.
Cátedra de Histología, Embriología General y Anatomía Patológica.
Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.
11003-Cádiz.

BIBLIOGRAFIA

1. ALBORES-SAAVEDRA, J.; ALCANTARA, A.; CRUZ, H.; HERRERA, R.: «The precursor lesions of invasive gallbladder carcinoma». *Cáncer*, 45: 919-927, 1980.
2. BLACK, W. C.: «The morphogenesis of gallbladder carcinoma». In: *Progress in surgical pathology*. Vol. II. Ed. Fenoglio, C. M.; Wolff, M. Masson, New York, 207-223, 1980.
3. GAHMBERG, C. G.; ANDERSON, L. C.: «Cell surface glycoproteins in normal and malignant human leucocytes». In: *Biology of the cancer cell*. K. Letnansky, Ed., Kugler Publications, Amsterdam, 209-225, 1980.
4. HENDRIX, R. W.; ZWAAN, J.: «The matrix of the optic vesicle presumptive lens interface during induction of the lens in the chick embryo». *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 33: 1023-1049, 1975.
5. HICKS, R. M.; WAKEFIELD, J. J.: «Membrane changes during urothelial hyperplasia and neoplasia». *Cáncer Res.*, 36: 2502-2507, 1976.
6. HODGES, G. M.: «Normal and neoplastic urothelium of human bladder in vivo and in vitro an assesment of SEM studies». *Scanning Electron Microscopy*, SEN Inc., AMF O'Hare, Vol. II, 983-990, 1978.
7. HOPWOOD, D.; KOUROUMALIS, E.; MILNE, G.; BOUCHER, J. A. D.: «Cholecystitis: a fine structural analysis». *J. Path.*, 130: 1-13, 1980.
8. KENEMANS, P.; VAN DER ZANDEN, P. H. T.; STOLK, J. G.; VOOYS, G. P.; STADHOUDERS, A. H.: «Cell surface ultrastructure in neoplasia of the uterine cervix». In: *Biology of cancer cell*. Ed. K. Letnansky, Kluger Publication, Amsterdam, 307-315, 1980.
9. LOPEZ, A.; VILCHES, J.; BENVENUTY, R.; BARDET, L.; GOMEZ, J.: «Aplicación de la microscopia electrónica de barrido en el

- estudio de la litiasis biliar. I. Revestimiento mucoso». *Rev. Esp. Enf. Ap. Digest.*, 61: 2, 113-116, 1982.
10. MURAKAMI, T.: «A revised tannin-osmium method for non coated scanning electron microscope specimens». *Arch. Histol. Jpn.*, 36: 189-193, 1974.
 11. MYLLARNIEMI, H.; NICKELS, J. I.: «Observations by scanning electron microscopy of normal and pathological human gallbladder epithelium». *Acta Path. Microbiol. Scand. A.*, 85: 42-48, 1972.
 12. NICOLSON, G. L.; POSTE, G.: «The cancer cell: dynamic aspects and modifications in cell surface organisation». *New Engl. J. Med.*, 295, 197-203, 1976.
 13. NICOLSON, G. L.; POSTE, G.: «The cancer cell: dynamic aspects and modifications in cell surface organisation». *New Engl. J. Med.*, 295: 253-259, 1976.
 14. PHELPS, P. C.; TOKER, C.; TRUMP, B. F.: «Surface ultrastructure of normal, adenomatous and malignant epithelium from human colon». *Scanning Electron Microscopy*, SEM Inc., AMF O'Hare, III, 169-176, 1979.
 15. PORTER, K. R.; FONTE, V. G.: «Observations on the topography of normal and cancer cell». *Scanning Electron Microscopy*, 683-688, 1973.
 16. REPASSY, G.; SCHAFF, Z.; LAPIS, K.; MARTON, T.; JAKAB, F.; SUGAR, J.: «Mucosa of the heister valve in cholelithiasis». *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 102: 403-405, 1978.
 17. SIEW, S.: «Scanning electron microscopy of neoplastic lesions of the human colon». *Scanning Electron Microscopy*, SEM Inc., AMF O'Hare, II, 11-17, 1976.
 18. SCHAFF, Z.; LAPIS, K.; CSIKOS, A.: «Scanning electron microscopic study of human gallbladder mucosa in cholelithiasis». *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.*, 21: 107-114, 1977.
 19. TANNENBAUM, M.; TANNENBAUM, S.; CARTER, H. W.: «SEM, BEI and TEM ultrastructural characteristic of normal preneoplastic and neoplastic human transitional epithelia». *Scanning Electron Microscopy*, SEN Inc., AMF O'Hare, II, 949-958, 1978.
 20. TRUMP, B. F.; BEREZESKY, J. K.; LAIHO, K. V.; OSORNIO, A. R.; MERGNER, W. J.; SMITH, M. W.: «The role of calcium in cell injury. A review». *Scanning Electron Microscopy*, SEM Inc., AMF O'Hare, II, 437-462, 1980.
 21. VESELY, P.; BOYDE, A.: «The significance of SEM evaluation of the cell surface for tumor cell biology». *Scanning Electron Microscopy*, SEM Inc., AMF O'Hare, 689-696, 1973.
 22. WILLIAMS, A. E.; SMITH, A. N.: «A scanning electron microscope study of normal and pathological human gallbladder». *Scanning Electron Microscopy*, SEM Inc., AMF O'Hare, II, 713-718, 1978.

(Recibido: 10-XII-84)