

Aplicación de la microscopía electrónica y de la inmunohistoquímica al estudio de los tumores malignos: Una revisión de su importancia diagnóstica.

Jorge García-Tamayo, Eduardo Caleiras, Eduardo Blasco-Olaetxea, David Parada, Saudy E. de García.

Unidad de Investigación en Patología Ultraestructural y Biología Molecular, Instituto Anatomopatológico, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Ultraestructura, inmunohistoquímica, diagnóstico, tumores.

Resumen. Se discuten los resultados del estudio con el microscopio electrónico de transmisión y con inmunohistoquímica de una muestra considerable de tumores malignos examinados en el curso de los últimos veinte años. Se dividieron las neoplasias en tumores de células epiteliales, tumores fusocelulares, tumores malignos de células redondas y tumores de naturaleza endocrina. Se destacan los principales hallazgos ultraestructurales y los resultados con inmunohistoquímica que contribuyen a hacer el diagnóstico preciso, señalando la importancia de estos estudios para el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de los enfermos de cancer.

The use of electron microscopy and immunohistochemistry in the diagnosis of malignant tumors. Review.

Invest Clin 38(4): 227-259, 1997.

Key words: Ultrastructure, immunohistochemistry, diagnosis, tumors.

Abstract. The results of examining in the course of the past twenty years a considerable number of malignant tumors with transmission electron microscopy and immunohistochemistry are discussed. The neoplasms were divided into epithelial tumors, tumors of fusiform cells, malignant round cell tumors and tumors of endocrine nature. The main ultrastructu-

ral findings and the results of immunohistochemical studies were pointed out regarding their contributory role in the diagnosis as well as for the prognosis and treatment of patients with cancer.

Recibido: 14-2-97. Aceptado: 12-11-97.

INTRODUCCIÓN

El microscopio electrónico de transmisión (MET) es útil para el diagnóstico de la patología humana; su aplicación en el estudio de las biopsias renales, las neuropatías periféricas y las miopatías forma parte de estudios rutinarios en Anatomía Patológica. Es útil para resolver problemas en enfermedades hematológicas, también se ha usado para detectar microorganismos, particularmente agentes virales, y de manera muy especial es utilizado para diagnosticar los tumores malignos poco diferenciados (1-8). El diagnóstico inmunohistoquímico de los tumores es hoy en día parte del arsenal de rutina para los patólogos (9-12) y si bien las complejidades metodológicas son cada vez menores, el mercado de producción de anticuerpos monoclonales es creciente y la publicación de hallazgos controversiales sobre el uso de numerosos anticuerpos hacen indispensable una interpretación cautelosa de los resultados. La gran ventaja de las técnicas de inmunohistoquímica se basan en que todas las reacciones se hacen in situ sobre material fijado en formol, incluido en parafina y en secciones histológicas similares a las que de rutina se examinan con hematoxilina-eosina (H&E), situación esta que por otra parte, permite

cualquier estudio retrospectivo, (9, 10).

Durante los últimos veinte años en el Instituto Anatomopatológico (IAP) de la Facultad de Medicina en la Universidad Central de Venezuela (UCV), hemos utilizado el MET para el diagnóstico de los tumores. Hemos combinado el estudio de la información clínica, la apariencia histopatológica de los tumores, su histoquímica y el estudio inmunohistológico con el uso diagnóstico del MET. La patología ultraestructural de los tumores malignos, es una poderosa arma para afianzar el diagnóstico del patólogo, sobre todo en los tumores malignos poco diferenciados, por otra parte, sirve como herramienta de investigación y la combinación de estos métodos debería ser de uso obligatorio para hacer docencia de postgrado, en cualquier ambiente académico donde se prepare personal en Anatomía Patológica.

En este trabajo se revisarán diversos aspectos de la aplicación de los estudios ultraestructurales e inmunohistoquímicos al diagnóstico de la patología tumoral. Hemos querido plasmar en él, nuestra experiencia adquirida a través del estudio de muchas muestras de las más variadas neoplasias señalando con ello la importancia del MET y de la inmunohistoquímica como armas

para el diagnóstico de los tumores malignos.

La serie de tumores malignos referida ha sido seleccionada entre muchos casos examinados en el curso de los últimos veinte años en la Sección de Microscopía Electrónica del IAP-UCV. Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron durante los últimos quince años en la misma Sección. Desde 1994 la Sección ha pasado a ser también la Unidad de Investigación en Patología Ultraestructural y Biología Molecular del IAP. Algunas de las muestras se fijaron directamente en glutaraldehído al 2,5% a pH 7,2 y a 4°C. La mayoría de las muestras de tumores fueron fijadas en formol tamponado al 7,5% en fosfato o cacodilato de sodio y algunas muestras fueron tomadas del material fijado en formol agua al 10%. En otros casos utilizamos material de tejidos previamente incluidos en parafina al detectar alteraciones específicas en los tejidos durante el estudio histológico para el diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL UTILIZADO

El material fue procesado para su estudio ultraestructural por métodos utilizados en nuestro laboratorio rutinariamente. Cuando estaban en parafina inicialmente, las muestras se desparafinizaron con calor y xilol para luego rehidratarse en pasos sucesivos. Las ventajas del formol tamponado y la comparación de los resultados obtenidos con este fijador y con el glutaraldehído han

sido señaladas previamente (10). Todas las muestras fueron postfijadas en tetraóxido de osmio al 2%, lavadas en solución amortiguadora y deshidratadas en alcoholes a concentraciones crecientes hasta óxido de propileno. Mezclas de óxido de propileno y resinas epoxy fueron procesadas hasta la inclusión en resina pura para su ulterior polimerización en estufa a 60°C, durante 48 horas. Se hicieron cortes de una micra de espesor con cuchillas de vidrio o de diamante para examinarlos en el microscopio de luz previa tinción con azul de Toluidina. Las áreas seleccionadas fueron señaladas y comparadas con la apariencia histológica de los diferentes tumores. Las pirámides con el material incluido fueron talladas y llevadas al ultramicrotomo para lograr secciones ultrafinas con cuchillas de vidrio o de diamante. Los cortes de 100 a 200 Å se contrastaron sobre rejillas de cobre de 300 mesh con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi - 500, a 80 Kv y con aumentos directos entre 2.500 y 25.000 x. Las fotografías tomadas con negativos en película de alto contraste, se revelaron, fijaron y copiaron a papel para su examen detallado caso por caso.

El estudio inmunohistoquímico de los tumores se hizo deparafinizando los cortes histológicos de dos a tres micras de espesor colocados en láminas con poly-l-lisina. Los cortes fueron colocados en xilol y se bloqueó la peroxidasa endógena en una solución de peróxido de hidró-

geno-metanol. Luego de lavar en PBS a pH 7.2, los cortes se incubaron en el anticuerpo primario contra diferentes antígenos, dependiendo de cada caso. Los anticuerpos más utilizados en casos de tumores fueron el Antígeno Leucocitario común (ALC), Antígeno epitelial de Membrana (EMA), Queratina AE1, Factor VIII, Antígeno Carcinoembrionario (CEA), Antígeno Prostático Específico, Proteína S-100, Desmina, Vimentina, HMB 45, Actina muscular-específica, Enolasa Neuronal Específica (NSE), Proteína ácida gliofibrilar, hormonas hipofisarias, Sinaptofisina, CD 99, CD 20, CD 45Ro, CD68, CD15, CD30 (DAKO). La incubación se hizo, habitualmente durante 30 minutos. Después de lavar en PBS se procedió a la incubación con el Anticuerpo Secundario Biotinilado durante 20 minutos. Luego de lavar en PBS, las muestras se colocaron en una cámara húmeda con el complejo Estreptavidina-peroxidasa con un revelado que osciló entre 5 y 10 minutos. Los cortes fueron teñidos luego con Hematoxilina de Harris y montados con bálsamo para su examen con el microscopio de luz.

Se revisaron los tumores procesados para su estudio ultraestructural desde 1976 hasta 1996. Con la intención de simplificar los criterios utilizados en la aplicación del MET para el diagnóstico de los tumores, hemos dividido las neoplasias en cuatro categorías: tumores epiteliales, tumores fusocelulares, tumores malignos de células redondas y brevemente diremos algo sobre los tu-

moreos de naturaleza endocrina. Esta división arbitraria sólo sirve para agrupar las neoplasias de la misma manera como fueron presentadas en los resultados y señalados en las Tablas I, II, III y IV.

Tumores Fusocelulares

Lelomiosarcoma, Leiomioblastoma, Tumor glómico, Rabdomiosarcoma, Fibrosarcoma, Fibromixoma, Dermatofibrosarcoma protuberans, Fibrohistiocitoma Maligno, Tumor rabdoide maligno, Sarcoma alveolar de partes blandas, Condrosarcoma mesenquimático, Mesenquimoma maligno, Liposarcoma, Liposarcoma Mixoide, Mixoma, Mixoma cardíaco, Mixoma odontogénico, Osteosarcoma, Fasciitis nodular, Fasciitis eosinofílica, Miofibromatosis, Fibromatosis digital infantil, Tumor desmóide Angiofibroma nasofaríngeo, Tumor Maligno de la Vaina de los Nervios Periféricos, Tumor de células granulares, Schwannoma maligno, Schwannoma epiteloide, Neurofibroma, Sarcoma epiteloide, Sarcoma Sinovial, Sarcoma de alto grado, Hemangioepiteloide, Angiosarcoma, Sarcoma de Kaposi, Hemangioendoteloma Epiteloide, Sarcoma de células claras.

Las características ultraestructurales (Fig. 1) en general, observadas en los diversos tumores fusocelulares examinados, son resumidas en la Tabla I.

Tumores Epiteliales y Epiteloideos

Adenocarcinoma primario y metastásico, ADC del pulmón, ADC de estómago, ADC y Adenoma de cé-

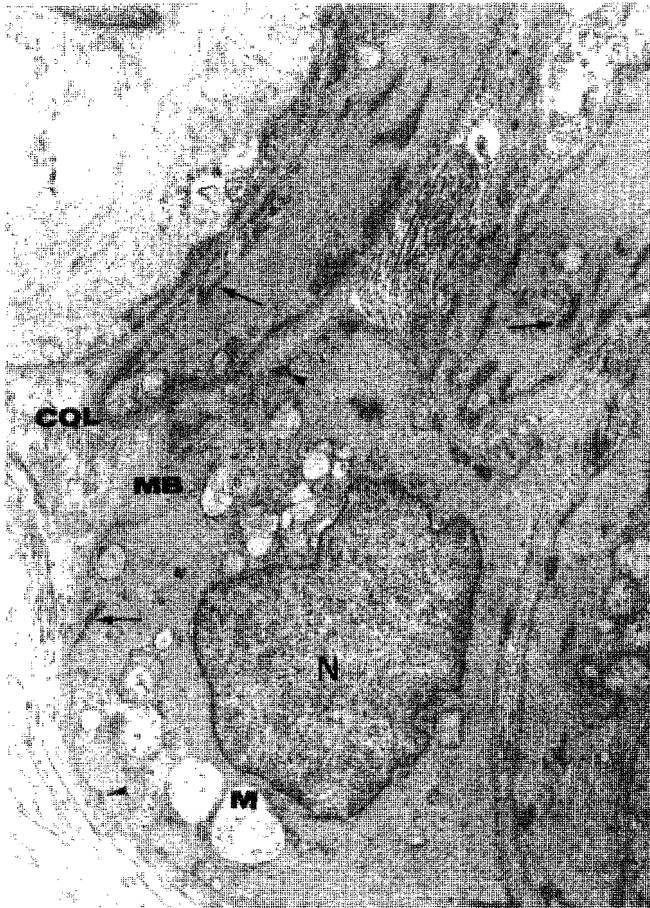


Fig. 1. Tumor fusocelular. Leiomioma. Se observan células cargadas de filamentos de actina y miosina con cuerpos densos (flechas), hemidesmosomas (cabezas de flechas) y lámina basal prominente (mb). En el citoplasma se ven algunas mitocondrias hinchadas (m), el núcleo (N) y fibras colágenas en el medio extracelular (col). x 20.000

lulas acinares, Adenoma pleomórfico de parótida, Carcinoma de vejiga urinaria, Carcinoma Epidermoide metastásico, Carcinoma Epidermoide de la laringe, Carcinoma indiferenciado metastásico, Papilomatosis laringea, Leucoplasia oral, Timoma, Papiloma oral, Carcinoma Epidermoide de la región parotídea, Tumor

del cuero cabelludo, Ca del antro maxilar, Ca de mucosa oral, Ca de rinofaringe, Ca del paladar, Ca ductal de la mama, Adenoma de paratiroideos, Ca apocrino, Hidradenocarcinoma, Ca de próstata, Tumor del Seno Endodérmico, Tumor de células de Leyding, Carcinoma Embrionario del testículo, Tumor de células

TABLA I
TUMORES FUSOCELULARES

| Diag | m.b | prol | rer | Nuc | nuc | ves | p | filam | mit | vacu | Vm | De | Ac | VIII | S100 |
|-------|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-------|-----|------|-----|----|-----|------|------|
| FS | - | + | +++ | + | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - |
| LMS | + | + | + | + | + | +++ | +++ | + | - | cd | + | - | + | - | - |
| SCWA | + | + | + | + | +/- | - | + | + | - | cSL | - | - | - | - | + |
| RMS | +/- | - | + | irr | + | - | +A-M | + | - | Z | + | + | +/- | - | - |
| TMVNP | +/f | + | + | + | +/- | - | + | + | - | cSL | - | - | - | - | + |
| DFSP | X | X | + | + | + | - | X | + | - | php | + | - | +/- | - | - |
| FHM | X | X | + | + | + | - | X | + | - | CeLM | + | - | +/- | - | - |
| HPC | + | + | + | + | +/- | - | + | + | - | - | + | - | +/- | - | - |
| HEE | + | + | + | + | + | - | + | + | + | Lic | + | - | + | + | - |
| ANGS | + | - | + | + | + | - | + | + | + | Lic | + | - | + | + | - |
| LPS | +/- | +/- | + | + | + | - | - | + | vg | Lip | + | - | - | - | + |
| OSTS | - | - | +++ | + | + | - | - | + | - | Cha | + | - | - | - | - |
| MIX | +/f | +/- | + | + | + | - | + | + | - | mpps | + | - | - | - | - |
| SS | + | - | + | + | +/- | - | + | + | +h | h | +/Q | - | - | - | - |
| □ SEP | +/f | - | + | + | +/- | - | + | + | - | - | +/Q | - | - | - | - |

m.b. = membrana basal, prol = prolongaciones, rer = retículo endoplasmático rugoso, Nuc = núcleo, nucl = nucleolo, ves p = vesículas de pinocitosis, filam = filamentos, mit = mitocondrias, vacu = vacuolas, misc = misceláneas, Vm = vimentina, De = desmina, Ac = actina, VIII = Factor VIII, S100 = proteína S-100. FS = Fibrosarcoma. LMS = Leiomiomasarcoma. SCWA = Schwannoma. RMS = Rabdomiosarcoma. TMVNP = Tumor Maligno de la Viana de los Nervios Periféricos. DFSP = Dermatofibrosarcoma protuberans. FHM = Fibrohistiocitoma Maligno. HPC = Hemangiopericitoma. HEE = Hemangiopericitoma Epiteleide. ANGS = Angiosarcoma. LPS = Liposarcoma. OSTs = Osteosarcoma. MIX = Mixoma. SS = Sarcoma Sinovial. SEP = Sarcoma Epiteleide. +/f = focal, X = Tumor con 4 tipos de células: fibroblastos, miofibroblastos, histiocitos y células mesenquimáticas primitivas, vg = grasa, h = hendiduras, c.d. = cuerpos densos, irr = irregular, A-M = filamentos de actina y miosina, Z = bandas Z, cSL = cuerpos de Sara Luse, php = puede haber pigmento melánico, CeLM = células multinucleadas, Lic = luces intracitoplasmáticas, Lip = lípidos, cha = cristales de hidroxipatita, mpps = mucopolisacáridos extracelulares, h = hendiduras, +/Q = positividad para Vimentina y Queratina.

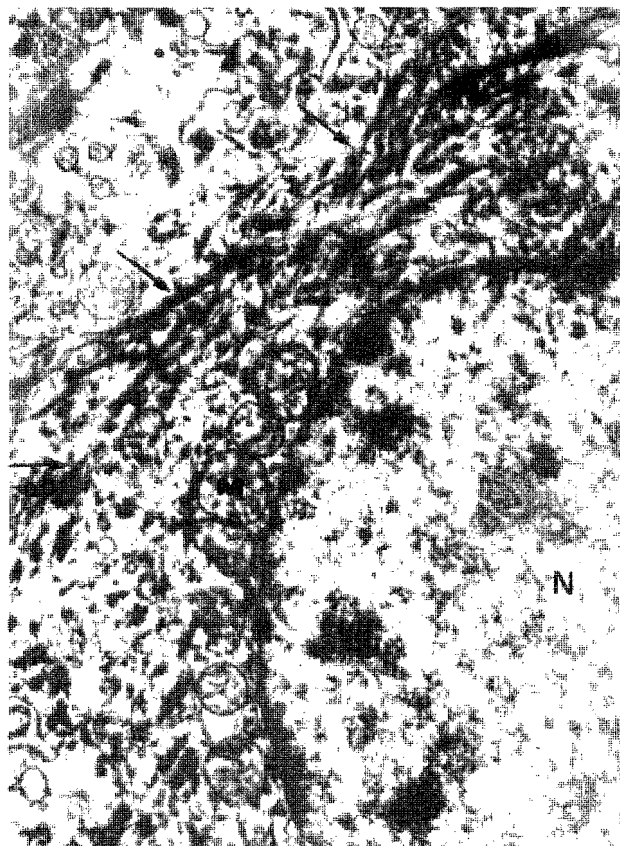


Fig. 2. Tumor epitelial. Carcinoma epidermoide del cuello uterino. Detalle de una célula tumoral con abundantes manojos citoplasmáticos de tonofilamentos (flechas) constituidos por queratina. Se observan varias mitocondrias paranucleares (m) y el núcleo (N) con la cromatina marginada. x 21.600

mioepiteliales, Tumor de la axila, Tumor de piel, Papulosis Bowenoid, Carcinoma epidermoide del cuello uterino, Carcinoma de células vídrias del cuello uterino, Carcinoma endometriode, Tumor Mixto Mülleriano, Tumores del riñón, Tumores del hígado, Melanoma, Tumores del ovario, Tumor papilar del páncreas.

Las características ultraestructurales (Fig. 2) en general, observa-

das en los diversos tumores de células epiteliales y de apariencia epitelioide examinados, son resumidas en la Tabla II.

Tumores malignos de células redondas

Linfoma de células grandes, Linfoma de Hodgkin, Linfoma difuso no Hodgkin, Linfoma folicular difuso, Linfoma de Células Grandes, Miosis Fungoides, Linfoma de Bur-

TABLA II
TUMORES EPITELIALES Y EPITELIOIDES

| Diag | mb | des | mad | mv | cil | fil | mel | lic | glic | Qt | Vm | EMa | S100 | Ac | AFP | CEA | VIII | ALC |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|----|-----|------|----|-----|-----|------|-----|
| ADC | + | +++ | + | + | + | + | - | +/- | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - |
| CaEP | + | +++ | + | - | - | + | - | +/- | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| CaIN | +0 | + | + | - | - | + | - | +/- | + | + | - | +/- | - | - | - | +/- | - | - |
| MES | + | + | + | +++ | - | + | - | + | + | + | - | +/- | - | - | - | - | - | - |
| CaDM | +0 | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - |
| Hcp | - | +0 | + | + | - | +/- | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| HepB | - | + | + | + | - | +/- | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| CaPan | + | + | + | + | - | +/- | - | +/- | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - |
| CaEm | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| SEM | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - |
| CorCa | - | - | + | +/- | - | - | - | +/- | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mioe | + | +/- | + | - | - | + | - | - | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| CaPr | +0 | + | + | + | - | + | - | +/- | + | + | - | +/- | - | - | - | - | - | - |
| CaR | + | + | + | + | - | +/- | - | - | + | +/- | - | + | - | - | - | - | - | - |
| CaPar | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mel | - | - | + | - | - | - | - | - | +/- | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ShEp | +++ | - | + | +/- | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| SaEp | - | +/- | + | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| HEE | + | + | + | +/- | - | + | - | - | - | + | + | - | +/- | - | - | - | - | - |
| LCC | - | - | +/- | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

ADC = adenocarcinoma; CaEP = carcinoma epidermoide; CaIN = carcinoma indiferenciado; MES=mesoteloma; CaDM = carcinoma de mama; Hep = hepatocarcinoma; HepB = hepatoblastoma; CaPan = carcinoma de páncreas; CaEm = carcinoma embrionario; SEM = seminoma; CorCa = coriocarcinoma; Mioep = mioepiteloma; CaPr = carcinoma de próstata; CaR = carcinoma renal; Mel = melanoma; ShEp = schwannoma epitelioide; SaEp = sarcoma epitelioide; HEE = hemangiendoteloma epitelioide; LCC = linfoma de células grandes anapláscas. mb = membrana basal; des = desmosomas; mad = mácula adherens; mv = microvellosidades; cil = cilios; fil = filamentos; mel = melanina; lic = lucas intracitoplasmáticas; glic = glicógeno; Qt = queratina; vm = vimentina; EMa = antígeno específico de membrana; S100 = proteína S100; Ac = actina; AFP = alfafetoproteína; CEA = antígeno carcinoembrionario; VIII = factor VIII; ALC = antígeno leucocitario común; +0 = membrana focalmente rota en tumores malignos; +/- = microvellosidades largas; * = sólo en células luminales



Fig. 3. Tumor maligno de células redondas. Detalle de una célula de Reed Sternberg en un Linfoma de Hodgkin, se ve el núcleo (N) y el nucleolo (flecha). Algunas mitocondrias (m) lucen vacías. En la periferia se ven prolongaciones en forma de pseudópodos (cabezas de flechas). El núcleo de una célula mononuclear se ve en un ángulo inferior. x 21.500

kitt, Linfoepitelioma, Linfoma inmunoblástico, Linfoma Mixto, Plasmocitoma, Neuroblastoma, Infiltración leucémica, Rabdomyosarcoma, Sarcoma de Ewing, Tumor de askin, Tumor de Wilms, Neumonitis linfomatoide-pseudolinfoma, Pseudolinfoma de partes blandas, Histiocitosis X, Granuloma Eosinofílico, Me-

duloblastoma metastásico, Sarcoidosis, Granulomatosis, Estesioneuroblastoma.

Las características ultraestructurales (Fig. 3) observadas en los diversos tumores malignos de células redondas examinados, son resumidas en la Tabla III.

TABLA III
TUMORES MALIGNOS DE CÉLULAS REDONDAS

| Diag: | mb | des | ma | fil | nuc | gli | Qt | Vm | EMA | S100 | Ac | Des | CEA | ALC | ENE | SNF | Otro |
|-------|-----|-----|----|------|------|-----|-----|-----|-----|------|----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| RMS | + | +/- | + | am | ir | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| LNH | - | - | - | - | r/ir | - | - | - | ** | - | - | - | - | + | - | - | - |
| LdeH | - | - | - | - | r/ir | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| S deE | - | + | + | + | r | + | - | +/- | - | - | - | - | - | - | - | +/- | - |
| TNEP | - | + | + | nef | r | + | - | - | - | +/- | - | - | - | - | + | + | - |
| NRB | - | + | + | nef | r | - | +/- | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - |
| TMD | - | + | + | * | r/ir | +/- | + | + | + | + | - | - | - | - | - | +/- | - |
| CaIN | +/- | +/- | + | +/-t | ir | +/- | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - |
| TdeW | + | + | + | ton | r | + | + | + | +/- | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PLAS | - | - | - | - | r | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| MerK | - | +/- | + | nef | r | - | +/- | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Ca NE | - | +/- | + | nef | r | +/- | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |

RMS = rabdomiosarcoma; LNH = linfoma no Hodgkin; LdeH = linfoma de Hodgkin; SdeE = sarcoma de Ewing; TNEP = tumor neuroectodérmico primitivo; NRB = neuroblastoma; TMD = tumor de células pequeñas desmoplásico divergente; CaIN = carcinoma indiferenciado; TdeW = tumor de Wilms; PLAS = plasmocitoma; MerK = tumor de Merkel; CaNE = carcinoma neuroendocrino. mb = membrana basal; des = desmosomas; ma = mácula adherens; fil = filamentos; nuc = núcleo; gli = glíceno; Qt = queratina; Vm = vimentina; EMA = antígeno específico de membrana; S100 = proteína S100; Ac = antina musculo liso específica; Des = desmina; CEA = antígeno carcinoembrionario; ALC = antígeno leucocitario común; ENE = enolasa neuronal específica; SNF = sinaptofisina; Bz = bandas zeta; ir = irregular; r = regular; am = actina/miosina; t = tonofilamentos; nef = neurofilamentos; * = actina, miosina, tonofilamentos, desmina; ** = 20-30% de los linfomas de células grandes anaplásicas es positivo.

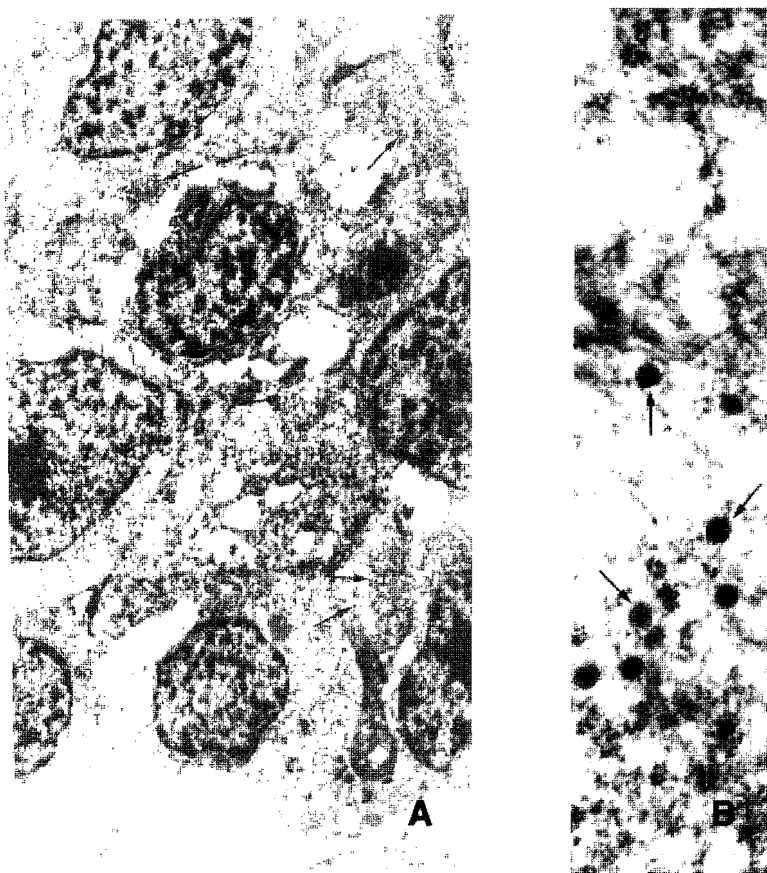


Fig. 4. Carcinoma neuroendocrino. 4a: Se ven células de núcleo redondeado con escaso citoplasma y áreas vacías, entre ellas hay prolongaciones con gránulos de neurosecreción (flechas). X 8.000 4b: Detalle de una prolongación celular con gránulos electrón-densos rodeados por un halo claro (flechas). x 50.000

Tumores de naturaleza endocrina

Carcinoma papilar, del tiroides, Carcinoma folicular del tiroides, Carcinoma medular del tiroides, Tumor de células de Hurtle, Tumor de células claras del tiroides, Adenoma de la paratiroides, Carcinoma de la paratiroides, Feocromocitoma, Paraganglioma, Glomus timpánico, On-

cocitoma, Glucagonoma,. Tumores de islotes pancreáticos, Tumor carcinoide, Carcinoide fusocelular, Carcinoma Neuroendocrino, Tumor Neuroectodérmico Primitivo, Tumor de células de Merkel, Carcinoma de células avooides del pulmón, Adenoma y carcinoma de la corteza suprarrenal, Adenomas hipofisarios.

TABLA IV
TUMORES ENDOCRINOS

| Diag | mb | des | gn | cris | nu | gli | qt | Vm | EMA | S100 | HCG | AFP | CEA | hhi | Sng | ENE | SNF | TIR | CAL |
|--------------|-----|-----|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Carcinoide | + | + | + | - | - | - | +/- | + | - | - | - | - | +/- | - | +/- | + | + | - | - |
| Tu. islot. P | +/- | + | + | - | - | - | -/+ | - | - | - | - | - | - | - | -/+ | + | + | - | - |
| Insulinoma | +/- | + | + | - | - | - | -/+ | - | - | - | - | - | - | - | -/+ | + | + | - | - |
| Paragangl. | +/- | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| Feocrom. | +/- | + | + | - | - | - | - | - | - | +cs | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| Gastrin. | + | + | + | - | - | - | +/- | +cs | - | - | - | - | +/- | - | + | + | + | - | - |
| Somatost. | + | + | + | - | - | - | +/- | +/- | - | - | - | - | +/- | - | + | + | + | - | - |
| Aden.Hipo | +/- | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | - | - |
| Cortocarc. | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | -/+ | - | - | - | - | - | - | - |
| Digermín. | +/- | +/- | - | - | + | ++s | - | - | - | - | -/+ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ca.Emb. | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | +/- | - | - | - | - | - | - | - |
| T.Sen End | + | + | - | - | +/- | + | - | - | - | - | + | - | +/- | - | - | - | - | - | - |
| T.Ser-Ley. | +/- | +/- | - | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ca Prostata | + | + | - | - | + | - | + | +/- | - | - | - | - | -/+ | - | - | - | - | - | - |
| Ca Fol. Tir | + | + | - | - | - | - | + | +/- | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Ca Pap.Tir | + | + | - | - | - | - | + | +/- | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| CaMed.Tir | +/- | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - | + |

Tu islot.P = Tumores de los islotes de pancreáticos; Paragangl. = paraganglioma; Feocrom. = feocromocitoma; Gastrin. = gastrina; Somatost = somatostatina; Aden.Hipof. = adenomas hipofisarios; Cortocarc. = cortocarcinoma; Digermín. = digermínoma; Ca.Embrión = carcinoma embrionario; T.Seno End. = tumor del senoendodérmico; T.Ser-Ley. = tumor de células de Sertoli-Leydig; Ca Prostata = Carcinoma de prostata; CA Fol.Tir = carcinoma folicular de tiroides; Ca Pap.Tir = carcinoma papilar de tiroides; Ca Med. Tir = Carcinoma medular de tiroides. mb = membrana basal; des = desmosomas; gn = gránulos neuroendocrinos; +* = cristales en gránulo de Insulina; +^s = gránulos de adrenalina y noradrenalina. cris = cristales (+ = cristales de Reinke); nu = núcleo prominente; gli = glicógeno; qt = queratina; Vm = vimentina; EMA = antígeno específico de membrana; S100 = proteína S100; HCG = gonadotropina coriónica humana; AFP = alfafetoproteína; CEA = antígeno carcinoembrionario; hhi hormonas hipofisarias(h. del crecimiento, prolactina, ACTH, TSH, MSH, FSH, LH, endorfinas); sng = secreción gastrointestinal(gastrina, somatostatina, VIP, glucagón, etc); ENE = enolasa neuronal específica; SNF = sinaptofisina; Tir = tiroglobulina; CAL = calcitonina; cs = células sustentaculares; ** = en las luces(EMA+); s = seminoma espermatocítico glicógenoescaso o ausente.

Las características ultraestructurales (Fig. 4) observadas en los diversos tumores de naturaleza endocrina examinados, son resumidas en la Tabla IV.

BASES PARA EL DIAGNÓSTICO ULTRAESTRUCTURAL

El diagnóstico ultraestructural de los tumores, se basa en el poder de resolución del MET, el cual permite penetrar en el citoplasma y señalar las características que identifican a las células de los diversos tejidos. La información sobre la ultraestructura de los tumores malignos poco diferenciados, puede ser importante para el patólogo y en ocasiones puede tener un decisivo valor diagnóstico (3, 4, 7). El diagnóstico ultraestructural de las neoplasias debe estar siempre precedido por el cuidadoso estudio clínico del enfermo. Es imprescindible tener información, lo más precisa posible, sobre la edad y el sexo del paciente, conocer la localización, el tamaño y la velocidad de crecimiento del tumor, así como otros datos clínicos relevantes y todos los detalles anatomopatológicos sobre el aspecto macroscópico de la lesión, su color y consistencia, si hay necrosis, o hemorragias, cual es la adherencia a los tejidos vecinos, si es superficial o profundo, datos estos que siempre deberán pesarse en el momento de examinar la ultraestructura de una neoplasia. La coloración de H&E sirve para que los patólogos rutinariamente puedan examinar histológicamente los tejidos tumorales. En es-

tos casos, del material incluido en parafina el patólogo puede hacer histoquímica enzimática y no enzimática y por supuesto, inmunohistoquímica. Hoy día el patólogo está obligado a precisar cuál es el origen histológico de cualquier tumor cuyo grado de indiferenciación pueda enmascarar su histogénesis. El definir esta situación es crucial porque desde hace ya muchos años los tratamientos para el cáncer pueden mejorar y curar un alto porcentaje de los pacientes y esto dependerá de un diagnóstico certero y preciso de la histogénesis de cada tumor.

TUMORES FUSOCELULARES

El diagnóstico de los tumores fusocelulares presenta el inconveniente de que la mayoría de las neoplasias mesenquimáticas tienen esta morfología (4, 5, 13). También pueden verse carcinomas epidermoides fusocelulares y algunos carcinomas de la nasofaringe con frecuencia resultan ser francamente sarcomatoides (4), en estos casos, ayuda la identificación inmunohistológica de las células fusiformes con marcadores como las queratinas, o el antígeno epitelial de membrana (EMA) (9, 10, 14), estos hallazgos y la observación ultraestructural de las características ya señaladas para las células epiteliales, hacen el diagnóstico (3, 4, 6). Algunos tumores fusocelulares pueden ser carcinosarcomas o carcinomas metaplásicos; en estos casos las evidencias un fenotipo epitelial como son los desmosomas, tonofilamen-

tos, luces intracitoplasmáticas, microvellosidades, presencia de lámina basal y otros, van paralelas a la identificación inmunohistoquímica de las queratinas de diferente peso molecular y a la negatividad para el antígeno carcinoembrionario (10, 14). Debe destacarse la posibilidad del mesotelioma sarcomatoide, además de su variante linfohistiocitoide y del mesotelioma desmoplásico (15). En estos casos la inmunohistología ayudará mostrando positividad para la queratina y ultraestructuralmente se verá la presencia de largas microvellosidades (4, 15, 16).

El sarcoma sinovial (SS) deriva de una célula mesenquimática primitiva similar a la que da origen al sarcoma epiteloide (17), neoplasias estas que son capaces de diferenciarse hacia células con un fenotipo epitelial (18). Cuando el SS es bifásico, las características de las células epitelioides facilitan el diagnóstico (3,4), cuando el SS es monofásico las células son fusiformes y puede plantearse el diagnóstico de fibrosarcoma, tumor maligno de la vaina de los nervios periféricos, leiomiomasarcoma o hemangiopericitoma; en estos casos puede requerirse la ayuda de la inmunohistología o de la ultraestructura para hacer el diagnóstico (19). En nuestra experiencia, aunque la inmunohistoquímica nos ha ayudado a demostrar la presencia de queratina de bajo peso molecular y de vimentina en más de siete casos de sarcoma epiteloide, y aunque no todas las células sarcomatosas expresan queratina, hemos logrado demostrar coexpresión de es-

tos filamentos en muchas células y en dos casos la vimentina ha resultado ser negativa.

La alteración de fenotipo de algunos tumores, pasando de fusocelulares a epitelioides, nos ha demostrado en el caso particular de ciertas neoplasias vasculares (20) que algunas características ultraestructurales permanecen inalterables en estos sarcomas siendo posible el diagnóstico con el MET. Las modificaciones del fenotipo inmunohistológico preceden a los cambios ultraestructurales (21, 22, 23), sin embargo, la experiencia de años estudiando las neoplasias malignas con el MET nos ha mostrado como este instrumento puede ser en ocasiones tan o más preciso que el inmunomarcaje (10). La presencia de células neoplásicas con fenotipo epiteloide a pesar de ser sarcomas o linfomas puede deberse a la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de la membrana plasmática, tales como las cadherinas (24, 25, 26).

La ultraestructura no aporta características que señalen la benignidad o malignidad de las neoplasias. Sabiendo que todos los tumores malignos fusocelulares tienen su contrapartida benigna, el uso del MET quedará restringido a detectar las características celulares que señalen el fenotipo histológico correspondiente, lo que resulta de utilidad en el diagnóstico de los tumores malignos pobremente diferenciados. El año 1971 y 1972 cuando Gabbiani y colaboradores describieron con el MET el miofibroblasto (27, 28), no se conocía la importancia de esta

célula híbrida, la cual es fundamental en el tejido de granulación (29), en el estroma de los tumores (30), en los fibrosarcomas y tumores fibrohistiocíticos (4, 31, 32), en las fibromatosis músculoaponeuróticas (33), en la fasciitis nodular (13) y en diversas proliferaciones miofibroblásticas agresivas (34). Desde hace años se han descrito sarcomas fusocelulares anaplásicos los cuales en el pasado eran diagnosticados como rhabdiosarcoma pleomórfico y liposarcoma pleomórfico, y hoy en día son reconocidos como fibrohistiocitomas malignos (FHM) (35).

El grupo de los tumores llamados fibrohistiocíticos es muy grande y frecuentemente el MET puede ayudar en el diagnóstico del FHM (4, 36, 37, 38). Los tumores fibrohistiocíticos, donde fibroblastos facultativos y miofibroblastos alternan con células mesenquimáticas primitivas (4), se caracterizan ultraestructuralmente por poseer esa variedad celular (32, 38), igualmente la inmunohistología es negativa para marcadores epiteliales o de células endoteliales o nerviosas (39). El FHM es un tumor que frecuentemente se puede confundir con Liposarcomas pleomórficos y tiende a ubicarse profundamente en el retroperitoneo y otros sitios donde estos sarcomas pueden desdiferenciarse dando complicaciones diagnósticas (23, 40, 41). El estudio con el ME de los FHM ha demostrado células mesenquimáticas primitivas con diversos grados de diferenciación, miofibroblastos, fibroblastos y células histiocíticas (4, 32, 37). Se ha discu-

tido ampliamente si el FHM es una neoplasia formada por células de estirpe fibroblástica e histiocítica, o solamente fibroblástica (42). Recientemente el examen de sarcomas indiferenciados comparados con FHM plantea el problema de la desdiferenciación (43, 44), situación esta que se da en sarcomas con anaplasia (41, 45). Fletcher (43) ha señalado, que el FHM es un tumor primitivo sin una diferenciación precisa, fibroblástica, miofibroblástica o de células posiblemente de estirpe fibroblástica, pero de apartencia histiocítica. Nuestra experiencia en este sentido ante un número considerable de tumores es similar (4, 32, 46). Lo mismo podemos decir sobre el conocimiento ultraestructural de los liposarcomas y del hibernoma así como de las complicaciones que representa la positividad inmunohistoquímica con la Proteína S-100 (47, 48).

El llamado leiomioblastoma fue descrito inicialmente por Salazar y Totem con el apoyo de la ultraestructura (49) y en 1976 Appleman y Helwig (50), propusieron el término de leiomiosarcoma epiteloide para estos leiomiosarcomas de carácter aparentemente más agresivo. Algunos de nuestros casos han sido publicados previamente (4, 5, 22). La ultraestructura e inmunohistoquímica pueden, en los leiomiosarcomas epiteloideos, demostrar la presencia de actina muscular específica (10) y características ultraestructurales bastante definidas para hacer este diagnóstico (22, 49). La descripción de tumores del estroma gas-

trointestinal (51, 52), ha venido a enriquecerse con la posibilidad detectada a través de estudios ultraestructurales e inmunohistoquímicos de que algunos de estos tumores representen neoplasias de los plexos mientéricos (52). Hoy en día muchas de estas neoplasias fusocelulares corresponden a los llamados tumores del estroma gastrointestinal (53, 54, 55). La posibilidad de que estas neoplasias sean de nervios periféricos o de células ganglionares o que manifiesten una diferenciación divergente ha sido enfatizada en los últimos años y se les ha denominado plexosarcomas (52, 56). Los tumores glómicos son de estirpe muscular lisa y como tales se identifican con el MET (4, 20, 57), o se detectan marcándolos con actina muscular específica (9, 10).

Así como los tumores de fibroblastos y de células musculares son característicamente fusocelulares, también lo son los sarcomas sinoviales monofásicos (4, 58) e igualmente los tumores de los nervios periféricos y de las células de Schwann (5, 59); en estos casos la membrana basal, las prolongaciones celulares, los cuerpos de Sara Luse y la positividad inmunohistológica para la proteína S-100 (10) hacen el diagnóstico; debe plantearse también la posibilidad de que la proteína S-100 se exprese en adenocarcinomas primarios y metastásicos (60).

La designación de tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos (TMVNP) engloba no solamente a los Schwannomas sino a

otros tumores malignos fusocelulares que pudieran derivarse de las células perineurales o de fibroblastos del perineuro (59). Algunos TMVNP son difíciles de diagnosticar por su parecido con otras neoplasias fusocelulares, las cuales pueden ir desde el FHM, el SS monofásico, el leiomioma, el fibrosarcoma y otros tumores de células fusiformes; la ayuda de la inmunohistología para el diagnóstico de los TMVNP se basa en la positividad para la Proteína S-100 y en muchos casos para la Vimentina, debiendo recordar que en los casos de tumores de la vaina perineural, la Proteína S-100 es negativa y se observa positividad para el antígeno epitelial de membrana (19). A pesar de que su apariencia no es fusocelular, debe mencionarse el tumor de células granulares, mal llamado mioblastoma, el cual puede ser solitario y benigno, subcutáneo o en la lengua, pero del cual se han descrito variantes malignas (61) con células fusiformes que se intercalan con las clásicamente granulares en las que la ultraestructura señala la membrana basal y los característicos gránulos como lisosomas pleomórficos multivesiculares (62, 63) con positividad para la Proteína S-100 por lo que se ha considerado su origen perineural o de las células de Schwann (64). Ya hemos mencionado como entre los tumores fusocelulares debe considerarse siempre en el diagnóstico el carcinoma fusocelular, melanoma (3,4), sarcoma sinovial (58) y sarcoma epiteloide

(17), así como los schwannomas malignos epitelioides (65).

La ayuda del ME ha sido para nosotros crucial en muchísimos casos, bien sea identificando estructuras miógenas en los tumores de músculo liso o estriado (4, 22, 66, 67), detectando la presencia de membrana basal y microtúbulos o filamentos en las células de Schwann (4), ubicando las características mencionadas de las células endoteliales y pericitos (20) y sobre todo la posibilidad de apoyarse en resultados de inmunohistología (10). La queratina de bajo peso molecular identifica inmunohistológicamente a los carcinomas fusocelulares, al sarcoma epitelioides o al sarcoma sinovial (9, 10). La proteína S-100 en schwannomas o melanomas, el HMB 45 en algunos melanomas, así como el uso de la desmina para las células de estirpe muscular estriada, son ejemplos de la aplicación de la inmunohistoquímica como complemento de la microscopía electrónica (9, 10, 67, 68).

El diagnóstico de hemangiendoteliooma vs hemangiopericitoma puede ser difícil, y con el MET, se encontrarán las células endoteliales y los pericitos con características similares; ambas poseen vesículas de pinocitosis, filamentos intermedios y lámina basal, pero en el caso del endotelio se pueden identificar luces entre las células y los cuerpos de Weibel Palade, los cuales ayudan al diagnóstico (4, 20, 69). La identificación inmunohistológica del Factor VIII ubicado ultraestructuralmente en los cuerpos de Weibel Palade es

un marcador útil para los tumores vasculares (10, 69), ausente en los pericitos y por lo tanto en los hemangiopericitomas.

TUMORES EPITELIALES Y EPITELIOIDES

En general, cuando el patólogo se enfrenta con tumores epiteliales, intentará la detección ultraestructural de desmosomas y tonofilamentos que le hablen de células epiteliales bien diferenciadas, o en los casos cuando piensa en diferenciación glandular, como puede ser al considerar el diagnóstico de un adenocarcinoma, buscará microvellosidades, tonofilamentos, luces intracitoplasmáticas y la lámina basal; si el tumor es de epitelios planos, sabrá identificar los desmosomas y reconocer los manojos de tonofilamentos de citoqueratina (4, 70, 71, 72). La presencia de luces intracitoplasmáticas con microvellosidades en muchas células pueden sugerir el diagnóstico de carcinoma ductal de la mama y es una característica citológica que puede y debe buscarse con H&E (21).

Ante el caso de un tumor de células grandes en el mediastino usualmente se plantea el diagnóstico de linfoma vs timoma (72), o linfoma vs carcinoma indiferenciado (10), o puede ser un tumor de origen embrionario (54, 73), la identificación de desmosomas y de tonofilamentos en manojos característicos, así como la lámina basal, apoyan la estirpe epitelial del tumor (4, 71, 72). En estos casos la positividad in-

munohistológica para la queratina puede facilitar el diagnóstico de timoma vs linfoma, en estos últimos el antígeno leucocitario común será positivo, muy evidente en los linfomas de células grandes (74, 75), anticuerpos como el CD 20 y el CD45Ro, son utilizados en nuestro laboratorio para determinar si la neoplasia es de linfocitos B o de linfocitos T (10). En un tumor pleural al plantearse el diagnóstico histológico de adenocarcinoma vs mesotelioma, la observación con el MET de largas microvellosidades identificarán las células mesoteliales, en tanto que la mayoría de los adenocarcinomas tienen vellosidades cortas (3, 4, 15, 16, 76). Las microvellosidades de los tumores de origen intestinal tienen filamentos en su interior los cuales pueden orientar el diagnóstico en una lesión epitelial metastásica (77, 78). El uso de queratinas de peso molecular variable puede ser muy preciso para corroborar por métodos inmunohistoquímicos estos hallazgos (4, 9, 79), sin olvidar el uso rutinario de la reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS) util para demostrar la presencia de glicógeno o de material PAS positivo que sugiera el diagnóstico de adenocarcinoma (10).

La demostración de queratina de pesos moleculares bajos, en los angiosarcomas puede crear problemas para el diagnóstico diferencial entre estas neoplasias y los tumores epiteliales; en algunos carcinomas, como ocurre en el pulmón, la diferenciación multidireccional de sus células puede ofrecer resultados in-

munohistológicos y ultraestructurales de difícil interpretación (80). El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una proteína oncofetal que se detecta en la membrana plasmática y en la secreción de las células del aparato gastrointestinal y en los adenocarcinomas; un ejemplo sobre el uso diagnóstico del CEA, es el del mesotelioma donde hallamos positividad a las queratinas de bajo peso molecular pero negatividad para el CEA, en tanto que en los adenocarcinomas el CEA es positivo (15). En tumores de células grandes, poco diferenciados, sobre todo en adultos y particularmente en el abdomen o en el retroperitoneo, se plantea con frecuencia el diagnóstico de carcinoma indiferenciado, o de adenocarcinoma y este puede confirmarse si existe positividad con el CEA y la queratina de bajo peso molecular, pero igualmente puede diagnosticarse un linfoma y detectarse en sus células CD 45 que corresponde al antígeno leucocitario común (9, 10, 75). En estos casos el MET siempre es de gran utilidad al demostrar tonofilamentos, desmosomas, vellosidades o membrana basal en los tumores epiteliales y su ausencia en los linfomas (1, 4, 76, 81).

Existen evidencias de una relación inversa entre la presencia de desmosomas y el grado de malignidad de los tumores epiteliales y estudios morfométricos han demostrado como disminuye la cohesividad de las células al aumentar su malignidad (82). Algunos de estos hallazgos se basan en observaciones hechas hace muchos años sobre la

membrana plasmática de las células neoplásicas (3), las cuales más recientemente han conducido a demostrar la expresión de moléculas de adhesión (83) o de antígenos de grupos sanguíneos (84) en tumores epiteliales y están siendo utilizadas como recientemente lo demostramos, como marcadores pronósticos en la evolución maligna de los mismos (85, 86).

La posibilidad de detectar agentes virales en tumores epiteliales, como el virus del papiloma humano (VPH) en las lesiones premalignas y malignas de cancer del cuello uterino, tanto con el MET como con inmunohistoquímica ha sido señalada previamente en trabajos de nuestro laboratorio (87-89), e igualmente se ha señalado la importancia del virus Epstein Barr en el carcinoma nasofaríngeo (90). La demostración reciente de la presencia de alteraciones del gen p53 y aparentemente del gen Rb en las células del cancer del cuello uterino infectadas con VPH 16 y 18 (91-93) señalan la importancia de la ultraestructura y los estudios de Biología Molecular no sólo para el diagnóstico, sino para entender mejor los mecanismos de patogenia implicados en la génesis y el tratamiento de algunos tumores epiteliales (94).

TUMORES MALIGNOS DE CÉLULAS REDONDAS

Son particularmente frecuentes en los niños, predominando en la región de la cabeza y el cuello (1, 2, 6). La importancia del estudio ul-

traestructural de los tumores malignos de células redondas (TMCR) ha sido señalada desde hace muchos años (1, 2, 4, 6, 21, 95, 96). Dentro de los TMCR es importante diferenciar los tumores en la infancia y en las personas adultas. En los niños los TMCR más frecuentes son los linfomas no Hodgkin y las leucemias (1), el sarcoma granulocítico (97), el rhabdomyosarcoma (27), el tumor de Ewing (98), el neuroblastoma y los tumores neuroectodérmicos periféricos (99), el sarcoma osteogénico y el tumor de Wilms (100). En los adultos deben considerarse en el diagnóstico diferencial de los TMCR además de los linfomas no Hodgkin y las infiltraciones leucémicas, los carcinomas indiferenciados, el plasmocitoma y mieloma múltiple, así como el tumor de Merkel, carcinomas neuroendocrinos y algunos sarcomas como el liposarcoma de células redondas (1, 4). Se ha calculado que aproximadamente un 15 a 27% de las neoplasias de niños o adultos jóvenes que son clasificadas dentro del grupo de los TMCR no pueden ser clasificadas (101), por lo que se emplean términos como "sarcoma embrionario", "sarcoma de histogénesis incierta", o "sarcoma de tipo indeterminado", etc (101-103).

El uso de la inmunohistología diagnóstica permite hacer el diagnóstico de linfoma por la positividad para el antígeno leucocitario común, o de neuroblastoma por la presencia de enolasa neuronal específica y así, combinando estas opciones inmunohistológicas con la apariencia ultraestructural vemos como en el

sarcoma de Ewing hay desmosomas, núcleos redondos, abundante glicógeno y puede utilizarse el anticuerpo CD 99 para su diagnóstico preciso, en los rhabdomyosarcomas se ven filamentos gruesos y finos que tienden a formar bandas Z y núcleos muy irregulares, con positividad para la desmina, y si el paciente es un adulto y se considera la posibilidad de un carcinoma indiferenciado o de un linfopitelioma, veremos desmosomas y tonofilamentos y positividad para la queratina (4, 10). En realidad ante las dificultades diagnósticas que el patólogo enfrenta con los TMCR, el apoyo de la inmunohistoquímica y de la microscopía electrónica es básico para dilucidar la histogénesis de estas neoplasias (2, 4, 6, 7, 10).

Hoy en día la Citogenética y la Biología Molecular son utilizadas en los procedimientos tendientes a esclarecer el diagnóstico de numerosos TMCR (104). Algunas de estas neoplasias constituyen un problema dentro de los TMCR en lo que se refiere a la dificultad para precisar el diagnóstico histopatológico y hemos visto muchos casos de tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos de la infancia (PNET), donde la posibilidad diagnóstica de sarcoma de Ewing extraesquelético, u óseo, o de rhabdomyosarcoma han sido revisados desde diversos ángulos (9, 105-112). La expresión del mismo protooncogén por parte de los PNET y del sarcoma de Ewing extraesquelético (107) y sus diferencias con los neuroblastomas, es un ejemplo de la complejidad de estas neoplasias a

pesar de sus indiscutibles similitudes histopatológicas (107, 109). Swanson y colaboradores (110) notaron diferencias entre el marcaje de las lectinas en los PNET y en los tumores de Askin, siendo estos hallazgos de gran interés para comprender mejor la biología de estas neoplasias. En nuestra experiencia, el inmunomarcaje positivo a la enolasa neural específica, para la sinaptofisina, o a los neurofilamentos es compartido por estos tumores usualmente ricos en glucógeno y en casos de sarcoma de Ewing, los mejores resultados los hemos obtenido con el anticuerpo CD99 (DAKO Corp).

Como se mencionó inicialmente, en cabeza y cuello, los TMCR son un problema complejo, sobre todo en la infancia (1, 2, 4, 6), en estos casos el rhabdomyosarcoma (RMS) embrionario es el tumor de partes blandas más frecuente en los niños y su localización más común es precisamente la cabeza y el cuello (67, 95, 102). En general en los niños el RMS se encuentra en los tejidos blandos periorbitarios, en la nasofaringe, la nariz, el oído medio y los senos paranasales y el estudio ultraestructural de estas neoplasias puede contribuir a precisar su diagnóstico (1, 67, 101, 102, 103, 112, 113). La apariencia histológica del RMS como un TMCR puede facilitar el diagnóstico, con la identificación del glicógeno en el citoplasma, hecho que se logra con una tinción de PAS y digestión enzimática, en estos casos también el diagnóstico de leucemia, linfoma y frecuente-

mente el de neuroblastoma se descarta por este método sencillo (10). La ayuda de la inmunohistoquímica con positividad para la desmina puede discutirse sobre la base de la presencia de desmina en algunos PNET (68), al igual como la actina muscular específica fue descrita en algunos tumores malignos de los nervios periféricos (64). Estas evidencias inmunohistoquímicas refuerzan el concepto de que, sobre un conocimiento preciso de la situación clínica y de la histología convencional, el auxilio del MET puede y debe contar con el apoyo de métodos inmunohistoquímicos (10).

Algunas de nuestras observaciones sobre los RMS y diversos TMCR han sido previamente descritas (1, 4, 10, 67). Hemos podido observar modificaciones histológicas en los RMS después del tratamiento con quimioterapia cuando termina por transformarse en una neoplasia mejor diferenciada, y sobre algunas fallas en la quimioterapia del RMS, las cuales algunos han asociado a la presencia de la Glicoproteína P, que puede ser demostrada por métodos inmunohistoquímicos (114). Hoy en día se conoce una relación entre la resistencia del RMS al tratamiento quimioterapéutico y la presencia de canales de Calcio en las células neoplásicas, por lo que se han utilizado antagonistas del Calcio terapéuticamente para oponerse a estos efectos; por otra parte también se sabe que existen defectos genéticos del tipo de la Trisomía de los cromosomas 2 y 20 en el RMS (92, 104, 115). En tumores de cabeza y cuello

en los niños, uno de los diagnósticos diferenciales a considerar es el sarcoma granulocítico (97); el MET muestra gránulos citoplasmáticos, el cloracetato de esterasa histoquímicamente es una prueba que presenta positividad e inmunohistológicamente la positividad para el anticuerpo CD15 también ofrece un arma diagnóstica complementaria.

Dentro del grupo de los TMCR debe incluirse tumor intrabdominal desmoplásico de células pequeñas con diferenciación divergente el cual se ve en niños, adolescentes y adultos jóvenes y es de mal pronóstico (116, 117). La ultraestructura puede servir para demostrar en las divergentes líneas de diferenciación, los gránulos neurosecretores, la apariencia glandular-epitelial, los desmosomas, membrana basal, microtúbulos, el estroma desmoplásico tiene áreas mixoides y se puede identificar también diferenciación miógena (117). Recientemente hemos podido examinar varios casos de esta entidad. En los niños los tumores retroperitoneales de células redondas, también pueden plantear el diagnóstico de tumor de Wilms vs neuroblastoma vs PNET (118, 119). El tumor de Wilms es ultraestructuralmente bastante característico, con células de apariencia epitelial, pero cuando estas células forman parte del blastema metanéfrico, pueden ser redondas u ovals y confundir en ausencia histológica de luces o de túbulos abortivos (118, 120). Debe también diferenciarse el tumor de Wilms de la variante sarcomatoide del carcinoma renal la

cual en niños puede tener apariencia rabdoide y es de mal pronóstico (120).

Los tumores retroperitoneales de células redondas en los adultos con frecuencia plantean el diagnóstico diferencial entre linfoma de células grandes, carcinoma indiferenciado, o melanoma metastásico. En estos casos la inmunohistología con ALC hace el diagnóstico de linfoma, las características con el ME de los linfomas de células grandes pueden estar presentes, no sólo por el nucléolo prominente, o por las prolongaciones ameboides del citoplasma que puede darle a la preparación una apariencia de neuropilo (1, 74, 121), sino más bien por descarte, en el sentido de notar la ausencia de desmosomas, de tonofilamentos, de estructuras que sugieran una neoplasia neuroendocrina y de otras imágenes que señalen la diferenciación no linfohematopoyética de la neoplasia. En los niños, los linfomas y las infiltraciones leucémicas pueden confundir el diagnóstico de RMS o de neuroblastoma (1, 2, 6, 67), en este sentido debe recordarse que las leucemias y linfomas siempre requieren de la hematología, aspirado de médula ósea y demás datos clinicopatológicos que sirvan para clasificar y tratar adecuadamente estas enfermedades.

Los linfomas difusos no Hodgkin también pueden ser confundidos en la infancia con el sarcoma de Ewing y demás tumores del grupo de los PNET (105, 106, 107, 108). Las características de las células convolutas o no, y la ausencia de in-

dicadores de otros fenotipos, ayudan al diagnóstico de estas neoplasias tanto como puede hacerlo el ALC (10); la apariencia ultraestructural convoluta de los núcleos en los linfomas es particularmente evidente en casos de micosis fungoides y en el síndrome de Sesary (122, 123). En los adultos, bien sea en tumores metastásicos o en lesiones primarias, cuando se piensa en carcinomas indiferenciados siempre se puede plantear el diagnóstico diferencial con los TMCR. Esto es frecuente en los carcinomas neuroendocrinos (124) y debe recordarse que con el MET es difícil detectar los gránulos de neurosecreción en estas neoplasias, los cuales deben buscarse más en las prolongaciones celulares que en el citoplasma. Igualmente, mientras más indiferenciado sea un carcinoma, menos

tonofilamentos y desmosomas se van a ver, por lo que todos estos detalles deben considerarse al examinarse un tumor epitelial con el MET (4). En las lesiones metastásicas de carcinomas poco diferenciados de la piel debe considerarse el llamado carcinoma trabecular de la piel o tumor de células de Merkel cuyas características ultraestructurales, comunes a los carcinomas neuroendocrinos han sido bien definidas (125, 126). En presencia de un TMCR con células grandes, la posibilidad de hallar con el MET microvellosidades o luces, membrana basal y uniones intercelulares orientará el diagnóstico hacia adenocarcinoma, en estos casos la inmunohistoquímica deberá ser positiva al

CEA y a la queratina de bajo peso molecular.

El gran imitador es el sobre-nombre que se le ha conferido en patología al melanoma ya que sus variables aspectos histológicos pueden confundir al patólogo cuando tiene que diagnosticarlo. Sabemos que la positividad para la proteína S-100, o para el anticuerpo HMB45, así como sus características ultraestructurales bien definidas son de gran importancia para precisar el diagnóstico de estos tumores malignos (4, 10, 60). Frecuentemente ante un tumor con células fusiformes, poligonales o de apariencia epitelioide, se planteará el diagnóstico diferencial de carcinoma indiferenciado vs sarcoma y es común que el patólogo piense en el gran imitador, el melanoma. Ultraestructuralmente, en las primeras etapas de la formación de la melanina, los premelanosomas todavía no se cargan de pigmento y se caracterizan por una matriz proteica con filamentos en zig zag, o con apariencia de huella de llanta de camión, cuando los melanomas son amelanicos, puede ocurrir que la inmunohistoquímica no ofrezca en la Proteína S-100 la especificidad que se desearía y que el anticuerpo HMB 45 resulte negativo (127). Algunos melanomas han resultado positivos a la citoqueratina (128) y a la NSE, así como con exagerada frecuencia se sabe que son reactivos a la Vimentina (129). Estos detalles son importantes ya que la detección de premelanosomas puede ser difícil con el ME, por lo que ante un tumor po-

bremente diferenciado la positividad a la Proteína S-100 y la detección de organelas con aspecto de gránulos, en ocasiones con estructuras membranosas o grumos, sugiere el diagnóstico de melanoma y debe insistirse en la búsqueda ultraestructural de los premelanosomas.

TUMORES ENDOCRINOS

Hemos examinado gran cantidad de tumores de naturaleza endocrina, en algunos de ellos como en el Feocromocitoma y los tumores de los islotes pancreáticos, el MET es de gran ayuda por la apariencia de sus gránulos bastante característicos (4, 10). También hemos examinado muchos tumores de la glándula tiroides y en muchos casos han sido correlacionados los hallazgos ultraestructurales con las características inmunohistoquímicas (resultados en vías de publicación). La posibilidad de detectar algunos marcadores como la serotonina o la cromogranina para diagnosticar tumores neuroendocrinos amplía el inicial uso de la enolasa neuronal específica en los carcinomas neuroendocrinos cuyo diagnóstico diferencial debe hacerse con los TMCT y en particular con los PNET ya se ha comentado previamente (10). El estudio reciente de varios casos de nesidioblastosis hace de la ultraestructura un elemento de importancia para el diagnóstico de esta alteración pancreática que puede afectar a niños recién nacidos. El uso de la gastrina en gastrinomas, la insulina, glucagon, o somatostatina en

tumores de islotes pancreáticos, calcitonina en los carcinomas medulares del tiroides (130), son de gran utilidad en el estudio de las neoplasias de glándulas endocrinas (4). La posibilidad de utilizar antígenos específicos contra ciertos tejidos u órganos, como es el caso del antígeno prostático específico, puede ser también una gran ayuda, especialmente para detectar tumores metastásicos. El uso de algunos marcadores como la Gonadotropina Coriónica y la Alfa-Feto proteína pueden facilitar el diagnóstico inmunohistoquímico en tumores germinales, en estos casos las características histoquímicas (abundante glicógeno) y ultraestructurales (nucléolos en cordón de zapato) de las células, pueden contribuir a precisar el diagnóstico (131).

Del conocimiento que los médicos generales y los oncólogos en particular tengan sobre estas nuevas armas con las que cuenta la Anatomía Patológica, se producirá cada vez más la solicitud hacia los patólogos de una mayor información sobre la naturaleza de las neoplasias. Es indiscutible que el precisar las características ultraestructurales o inmunocitoquímicas de los tumores puede ser crucial para el pronóstico y el tratamiento adecuado de numerosos pacientes afectados por diversos tipos de cáncer.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- ALTARÁS P., GARCÍA-TAMAYO J., ROSAS-URIBE A.: El microscopio electrónico de transmisión en el diagnóstico dife-

rencial de los tumores malignos de células redondas. *Patología (Mex)* 1982; 20:77-96.

- 2- DARDICK Y., DARDICK A., REBB Y., CARPENTER B., JIMENEZ C., NIZALIK E.: Role of Electron Microscopy in head and neck pathology in adults and children. *Ultrastruct Pathol* 1993; 17:427-442.
- 3- ERLANDSON R.A.: Diagnostic Transmission Electron Microscopy of Tumors. Raven Press LTD Edit. 1994.
- 4- GARCÍA-TAMAYO J.: Aspectos ultraestructurales de la patología tumoral. *Invest Clin* 1982; 3:123-215.
- 5- GUEVARA M.E., MOTA D., GRASES P.J., GARCÍA-TAMAYO J.: Tumores fusocelulares de difícil diagnóstico: estudio histológico y ultraestructural. *Morfol Norm y Patol. Secc B (Esp)* 1980; 4:533-548.
- 6- REGEZI J.A., BALTZAKIS J.C.: Diagnostic Electron Microscopy of Head and Neck Tumors. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102:8-14.
- 7- ROSAI J., RODRIGUEZ H.A.: Application of Electron Microscopy to the Differential Diagnosis of Tumors. *Am J Clin Pathol* 1968; 50:555-562.
- 8- VANHAELST U.J.G.M.: General considerations on Electron Microscopy of Tumors of Soft Tissues. *Progress in Surg Pathol Vol II Cl Fenoglio y M Wolff Editores. Masson Publ* 1981.
- 9- BATTIFORA H.: Recent Progress in the immunohistoche-

- mistry of solid tumors. *Sem Diag Pathol* 1984; 1:252-271.
- 10- GARCÍA-TAMAYO J.: Ultraestructura e inmunohistoquímica como ayuda diagnóstica en *Anatomía Patológica. Rev Ven de Oncología* 1991; 3:1-7.
 - 11- HSU S.M., RAINE L., FANGER H.: A comparative study of the PAP method and avidin-biotin-complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Path* 1981; 75:734-738.
 - 12- STERNBERGER L.A., HARDY P.H., CUCULIS J.J., MEYER H.B.: The unlabeled antibody enzyme method for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1970; 18:315-333.
 - 13- RUIZ M.E., GARCÍA-TAMAYO J., RENNOLA A., CALCAÑO G.: Fasciitis pseudosarcomatosa: una lesión de miofibroblastos que simula sarcoma. Descripción de dos casos. *Patología (Mex)* 1988; 26:161-165.
 - 14- OGAWA K., KIM Y.C., NAKAHISMA Y., YAMABE H., TAKEIDA T., HAMASHIMA Y.: Expression of epithelial markers in sarcomatoid carcinoma. An immunohistochemical study. *Histopathology* 1987; 11:511-522.
 - 15- ORDOÑEZ N.G.: The immunohistochemical diagnosis of Mesotelioma: differentiation of Mesotelioma and lung Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1989; 13:276-291.
 - 16- SALAZAR H., KANBOUR A., BORGESS F.: Ultrastructure and observations on the histogenesis of mesotheliomas "adenomatoid tumors" of the female. *Cancer* 1972; 29:141-151.
 - 17- ENZINGER FM. Epithelioid sarcoma. A sarcoma simulating a granuloma or a carcinoma. *Cancer* 1970; 26:1029-1041.
 - 18- MIETTINEN M., VIRTANEN Y.: Synovial sarcoma - a misnomer. *Am J Pathol* 1984; 117:18-25.
 - 19- FISHER C., CARTER R.L., RAMACHANDRA S., THOMAS D.M.: Peripheral nerve sheath differentiation in malignant soft tissue tumors: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Histopathology* 1992; 20:115-125.
 - 20- GARCÍA-TAMAYO J., RUIZ M.E.: Hemangioma histiocitoide y hemangioendotelioma epitelioide. Estudio histológico, inmunohistológico y ultraestructural. *Patología (Esp)* 1989; 22:170-180.
 - 21- BATTIFORA H.: Intracytoplasmic lumina in breast carcinoma. A helpful histopathologic feature. *Arch Pathol* 1975; 99:614-617.
 - 22- GARCÍA-TAMAYO J., FRAIZ-GRIJALBO T., OVIEDO-AYALA N., PINTO J.A.: Tumores de músculo liso estudio clínico, histológico y ultraestructural. *Patología (Mex)* 1980; 18: 221 - 238.
 - 23- SALAS E., ANCHUSTEGUI C., GARCÍA-TAMAYO J., COHEN R.: Leiomiomas intestinal. Leiomiomas retroperitoneal

- asociado a Liposarcoma del Mesocolon. Estudio clinicopatológico y ultraestructural de dos casos. *Rev Ven de Oncol* 1991; 3:11-19.
- 24- ASHTON-KEY M., COWLEY G.P., SMITH M.E.F.: Cadherins in reactive lymph nodes and lymphomas: high expression in anaplastic large cell lymphomas. *Histopathology* 1996; 28: 55-59.
- 25- LUI D., NIGAM A.K., LALANI E.N., STAMP G.W.H., PIGNATELLI M.: Transfection of E-cadherin cDNA into a colon cell line, enhances intercellular adhesion and differentiation. *J Pathol* 1993; 169:120A (suppl.).
- 26- SHIMOYAMA Y., HIROHASHI S., HIRANO S., NOGUCHI M., SHIMOSATA Y., TAKEICHI M.: Cadherin cell-adhesion molecules in human tissues and carcinomas. *Cancer Res* 1989; 49:2128-2133.
- 27- GABBIANI G., RYAN G.B., MANJO G.: Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 27: 549-550.
- 28- GABBIANI G., MANJO G.: Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1972; 66:131-146.
- 29- RYAN G.B., CLIFF W.J., GABBIANI G.: Myofibroblasts in human granulation tissue. *Human Pathol* 1974; 5:55-67.
- 30- SEEMYER T.A., SCHÜRCH DB., LEGACE R., TREMBLAY G.: Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma. A possible host response to neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1979; 3:525-533.
- 31- CHURCH A.M., KHAN L.B.: Myofibroblasts and related cells in malignant fibrous and fibrohistiocytic tumors. *Human Pathol* 1977; 8:205-218.
- 32- MICHELENA A., DELGADO G.E., GARCÍA-TAMAYO J.: Fibrohistiocitoma Maligno de hueso. Presentación de cinco casos. *Patología (Mex)* 1980; 18:281-295.
- 33- STILLER D., KATENKAMP D.: Cellular features in desmoid fibromatosis and well differentiated fibrosarcoma. An Electron Microscopic study. *Virchows Arch A* 1975; 369:155-164.
- 34- WIRMAN J.A.: Nodular fasciitis, a lesion of myofibroblasts. An ultrastructural study. *Cancer* 1976; 38:2378-2389.
- 35- REDDICK R.L., MICHELITCH H., TRICHE T.: Malignant Soft Tissue tumors (Malignant Fibrous histiocytoma, Pleomorphic Liposarcoma and Pleomorphic Rhabdomyosarcoma): An Electron Microscopic Study. *Human Pathol* 1979; 10: 327 - 343.
- 36- ALGUACIL-GARCÍA A., UNNI K.K., GOELNER J.R.: Malignant fibrous histiocytoma. An ultrastructural study of six cases. *Am J Clin Pathol* 1978; 69:121-129.

- 37- FU Y.S., GABBIANI G., KAYE G.I., LATTES R.: Malignant soft tissue tumors of probably histiocytic origin (malignant fibrous histiocytomas): general considerations and electron microscopic and tissue culture studies. *Cancer* 1975; 35:176-198.
- 38- HARRIS M.: The ultrastructure of benign and malignant fibrous histiocytomas. *Histopathology* 1980; 4:29-44.
- 39- ROHOLL P.J.M., KLEYNE J., VAN UNNIK J.A.M.: Characterization of tumor cells in malignant fibrous histiocytomas and other soft tissue tumors, in comparison with malignant histiocytes. II Immunoperoxidase study on cryostat sections. *Am J Pathol* 1985; 121:269-274.
- 40- HERRERA G., REIMANN B.E.F., SALINAS J.A., TURBAT E.A.: Malignant schwannomas presenting as malignant fibrous histiocytoma. *Ultrastruct Pathol* 1982; 3:253-261.
- 41- SNOVER D.C.: Variability of histologic pattern in recurrent soft tissue sarcomas originally diagnosed as liposarcoma. *Cancer* 1982; 49:1005-1015.
- 42- DEHNER L.P.: Malignant fibrous histiocytoma. Non specific morphologic pattern, specific pathologic entity, or both? Editorial. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112:236-237.
- 43- FLETCHER C.D.M.: Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: fact or fiction? A critical reappraisal based on 159 tumors diagnosed as pleomorphic sarcoma. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:213-228.
- 44- HASHIMOTO H., DAIMARU Y., TSUREYOSHI M., ENJOJI M.: Soft Tissue sarcoma with additional anaplastic components. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 27 cases. *Cancer* 1990; 66: 1578-1589.
- 45- BROOKS J.J.: The significance of double phenotypic patterns and markers in human sarcomas. A new model of mesenchymal differentiation. *Am J Pathol* 1986; 125: 113-123.
- 46- GOMEZ J., FERRER-OCHOA E., MUÑOZ J.G., AVILA-MAYOR A., GARCÍA-TAMAYO J.: Fibrohistiocitoma Maligno Retroperitoneal en un niño con agenesia renal izquierda. *Acta Med Ven* 1982; 29:47-53.
- 47- GARCÍA-TAMAYO J., TEJEDA F., CANACHE A.: La ultraestructura del tejido adiposo neoplásico. *Morfol Norm Patol B (Esp)* 1982; 6:146-153.
- 48- GUILLEN N., GARCÍA-TAMAYO J.: Hibernoma: estudio histológico y ultraestructural. *Morfol Norm Patol B (Esp)* 1980; 4: 533 - 548.
- 49- SALAZAR H., TOTEM RS.: Leiomyoblastoma of the stomach. An ultrastructural study. *Cancer* 1970; 25:176-185.
- 50- APPLEMAN H., HELWIG E.B.: Gastric epithelioid leiomyoma and leiomyosarcoma

- (leiomyoblastoma). *Cancer* 1976; 38:708-728.
- 51- MIETTINEN M.: Gastrointestinal stromal tumors. An immunohistochemical study of cellular differentiation. *Am J Clin Pathol* 1988; 98:601-610.
- 52- HERRERA G., CERESO L., JONES J.E.: Gastrointestinal autonomic nerve tumors."Plexosarcomas". *Arch Pathol Lab Med* 1989; 27:275-284.
- 53- APPLEMAN H.: Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract. What we know now that Stout didnt know. *Am J Surg Pathol* 1896; 10:83-89.
- 54- HERRERA G.A., CERESO L., JONES J.E.: Gastrointestinal autonomic nerve tumors."Plexosarcomas". *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 846-853.
- 55- MIN K.W.: Small intestinal stromal tumors with skeinoid fibers. Clinicopathological, immunohistochemical and ultrastructural investigations. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:145-155.
- 56- WALKER P., DVORAK M.: Gastrointestinal autonomic nerve (GAN) tumor. Ultrastructural evidence of a newly recognized entity. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 309-316.
- 57- MOTA J.D., BLANCO-TORO M., GARCÍA-TAMAYO J.: Tumor glómico de la traquea. *Patología (Esp)* 1991; 24:163-166.
- 58- ORDOÑEZ N.G., MAHFOUZ S.M., MACKAY B.: Synovial sarcoma: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Human Pathol* 1990; 21:733-749.
- 59- ERLANDSON R.A.: Peripheral nerve sheath tumors. *Ultrastruct Pathol* 1985; 9:113-122.
- 60- HERRERA G., TURBAT-HERRERA E.A., LOTT R.L.: S-100 protein expression by primary and metastatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 1988; 89:168-176.
- 61- FINKEL G., LANE B.: Granular cell variant of neurofibromatosis: ultrastructure of benign and malignant tumors. *Hum Pathol* 1982; 13:959-963.
- 62- 62 - MIETTINEN M., LETHONEN E., LETHOLA H., ECKBLOM P., LETHO V.P., VIRTANEN I.: Histogenesis of granular cell tumor- an immunohistochemical and ultrastructural study. *J Pathol* 1984; 142: 221-229.
- 63- ROBERTSON A.J., MCINTOSH W., LAMONT P., GUTHRIE W.: Malignant granular cell tumor (myoblastoma) of the vulva: report of a case and review of the literature. *Histopathology* 1981; 5:69-79.
- 64- MEIS J.M., ENZINGER F.M., MARTZ K.L., NEAL J.A.: Malignant peripheral nerve sheath tumors (malignant schwannoma) in children. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 694-707.
- 65- LODDING P., KINDBLOM L.G., ANGERVALL L.: Epithelioid malignant schwannoma. A study of 14 cases. *Virchows Arch A* 1986; 409:433-451.

- 66- AVILA-MAYOR A., FERREIRA-MORALES E. GARCÍA-TAMAYO J., FERRER-OCHOA E.: Tumores primarios del corazón: reporte de cuatro casos y estudio inmunohistoquímico y ultraestructural del rabiomioma. *Acta Med Ven* 1983; 30:67-79.
- 67- BIANCHI I.G., GARCÍA-TAMAYO J., RUIZ M.E.: Rabiomioma. Estudio histológico y ultraestructural de 17 casos. *Rev Ven Oncol* 1992; 4:1-5.
- 68- PARHAM D.M., DIAS P., KELLY D.R., RUTLEDGE J.C., HOUGHTON P.: Desmin positivity in primitive neuroectodermal tumours of childhood. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 483-492.
- 69- WEIBEL E.R., PALADE G.E.: New Cytoplasmic components in arterial endothelia. *J Cell Biol* 1964; 23:101-112.
- 70- GARCÍA-TAMAYO J., RINCONES J. DE, ABREU G. DE.: Ultraestructura de lesiones benignas y malignas de la mama. *Acta Med Ven* 1983; 30:134-138.
- 71- RUIZ A., ROSAS-URIBE A., GARCÍA-TAMAYO J.: Tumores pediátricos epiteliales y mesenquimáticos malignos: características clínicas y patológicas en 34 pacientes. *Patología (Mex)* 1992; 30:167-177.
- 72- MARCANO E., ROSAS-URIBE A., GARCÍA-TAMAYO J., ANGULO-ORTEGA A.: Timomas. Estudio clinicopatológico de 15 pacientes. *Patología (Mex)* 1982; 20:227- 243.
- 73- SUAREZ R., QUINTERO-MONASTERIOS R., SUAREZ J.A., GARCÍA-TAMAYO J., GONZALEZ N.: Tumor del seno endodérmico: presentación de un caso y revisión de la literatura. *Acta Med Ven* 1982; 28:238-245.
- 74- ERLANDSON R.A., FILIPPA D.A.: Unusual non Hodgkins lymphomas and true histiocytic lymphomas. *Ultrastruct Pathol* 1989; 13: 249 - 273.
- 75- HALL P.A., ARDENNE A.J., STANSFELD A.G.: Parafin section immunohistochemistry I- Non Hodgkins lymphoma. *Histopathology* 1988; 13:149-160.
- 76- MOTA J.D., OTAMENNDI V., ARROYO A.S., GARCÍA-TAMAYO J.: Cistadenocarcinoma mucinoso del pancreas: hallazgos histológicos y ultraestructurales. *Patología (Esp)* 1991; 24:167-170.
- 77- ENGSTRAND D.A., ENGLAND D.M., OBERLY T.D.: Limitations of the usefulness of microvillous ultrastructure in distinguishing between carcinoma primary and metastatic to the lung. *Ultrastruct Pathology* 1987; 11:53-58.
- 78- TRIER J.S.: The surface coat of gastrointestinal epithelial cells. *Gastroenterol* 1969; 56:618-622.
- 79- COOPER D., SHERMER A., SUN T.T.: Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratin: strategies,

- applications and limitations. *Lab Invest* 1985; 56:243-256.
- 80- SABA S.R., AZAR H.A., RICHMAN A.V.: Dual differentiation in small cell carcinoma (oat cell carcinoma) of the lung. *Ultrastruct Pathol* 1981; 2:131-138.
- 81- SALAZAR H., MERKOW L.P., WALTER W.S., PARDO M.: Human ovarian neoplasm light and electron microscopic correlations II. The clear cell tumor. *Obst Gynecol* 1974; 40:2209-2215.
- 82- MCDONAGH D., VOLLMER R.T., SHELBURNE I.D.: Inter-cellular Junctions and tumor behavior in lung cancer. *Modern Pathol* 1991; 4:436-440.
- 83- HYNES R.O.: Integrins versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.
- 84- BLASCO E., GUTIERREZ-HOYOS A., LOJENDIO M.J., COSME A., ARENAS J.I.: Expression of Type I blood group precursor in human gastric carcinoma. *Europ J Cancer* 1991; 27:501-507.
- 85- BLASCO-OLAETXEA E., LOIZATE A., GARCÍA-TAMAYO J.: Prognostic significance of high expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen in patients with Intestinal Metaplasia. *Anticancer Res* 1996; 16:963-968.
- 86- BLASCO-OLAETXEA E., BELLOSO L.K., GARCÍA-TAMAYO J.: Superficial Bladder Cancer. Study of the Proliferative Nuclear Fraction as a Prognostic Factor. *Europ J Cancer* 1996; 32: 444-446.
- 87- BORGES R. DE, GARCÍA-TAMAYO J., ZAITTMAN M.: Cytologic and ultrastructural findings of a peculiar alteration of cervical cells in patients with HPV infection. *Acta Cytol (USA)* 1989; 33:314-318.
- 88- GARCÍA-TAMAYO J., NUÑEZ-MONTIEL J.T.: Investigación con el microscopio electrónico sobre la papilomatosis cérvico-vaginal. *Acta Med Ven* 1978; 25: 132-138.
- 89- RINCÓN-MORALES F., GARCÍA-TAMAYO J.: Infección por virus papiloma humano (VPH) de la vulva. Aspectos clínicos, histológicos y ultraestructurales. *Rev Ven Obst Ginecol* 1983; 43:203-215.
- 90- ANAGNOSTOPULOS Y., HUMMEL M.: Epstein-Barr virus in tumours. *Histopathology* 1996; 29: 292-315.
- 91- MÜNGER K., WERNESS B.A., DYSON N., PHELPHS W.C., HOWLEY P.M.: Complex formation of HPV E7 proteins with the Rb tumour suppressor gene product. *EMBO J* 1989; 8:4099.
- 92- SAWYER J.R., TRIYKA A.F., LEWIS J.M.: A novel reciprocal chromosome translocation t(11;22)(p13;q12) in an intradominal desmoplastic small round cell tumor. *Am J Sug Pathol* 1992; 16:411-416.
- 93- WERNESS B.A., LEVINE A.J., HOWLEY P.M.: Association of

- HPV type 16 and 18 E6 protein with p 53. *Science* 1990; 242:76-79.
- 94- VICENTE J., LOBO F., DÓMINE M., GARCÍA-RICO E.: Enfoques moleculares para el tratamiento del cancer. *Oncología (Esp)* 1995; 18:335-350.
- 95- DEHNER L.P.: A contemporary view of neoplasms in children. The pathologists perspective. *Pediat Clin North Amer* 1989; 36:113-137.
- 96- LLOMBART-BOSCH A., BLANCHE R., PEYDRO-OLAYA A.: Round cell sarcomas of bone and their differential diagnosis (with particular emphasis on Ewings sarcoma and reticulosarcoma) A study of 233 tumors with optical and electron microscopic techniques. *Pathol Annu* 1982; 17:113-145.
- 97- ARNAL-MONREAL F.M., ALVAREZ-FERNANDEZ J.C., SANCHEZ-VALERA J.M., MARINIDIAZ M.: Meningeal granulocytic sarcoma without evidence of leukemia. Light and ultrastructural study of one case. *Virchow Arch A*, 1981; 392:111 - 118.
- 98- DEHNER L.P.: Primitive neuroectodermal tumor and Ewings sarcoma. *Am J Surg Pathol*, 1993; 17:1-13.
- 99- LLOMBART-BOSCH A, LACOMBE M.J., CONTESSO G., PEYDRO-OLAYA A.: Small round blue cell sarcoma of bone mimicking atypical Ewings sarcoma with neuroectodermal features. An analysis of five cases with immunohistochemical and electron microscopic support. *Cancer* 1987; 60:1570-1582.
- 100- MIREAU G.W., BECKWITH J.B., WICKS D.A.: Ultrastructure and histogenesis of the renal tumor of childhood: an overview. *Ultrastruct Pathol* 1987; 11:313-333.
- 101- ERLANDSON R.A.: The ultrastructural distinction between rbdomyosarcoma and other undifferentiated sarcomas. *Ultrastruct Pathol* 1987; 11:83-101.
- 102- GONZALEZ-CRUSSI F., BLACK-SCHAFFER S.: Rbdomyosarcoma of infancy and childhood. Problems of morphologic clasification. *Am J Surg Pathol* 1979; 3: 157 -171.
- 103- SHIMADA H., NEWTON WA., SOULE E.H., BELTANGADY M.S., MAURER HM.: Pathology of fatal rbdomyosarcoma. Report from Intergroup Rbdomyosarcoma Study (IRS-I and IRS-II) *Cancer* 1987; 59: 459-465.
- 104- CALLEN D.F., SMITH R.D., BOURNE A.J.: Chromosomal analysis in Ewings sarcoma. *Pathology* 1987; 19:64-66.
- 105- ERLANDSON R.A.: Ewings sarcoma with intermediate filaments. *Ultrastruct Pathol* 1983; 5:323-328.
- 106- MIREAU GW.: Extraskelatal Ewings sarcoma (peripheral neuroepithelioma). *Ultrastruct Pathol* 1985; 9:91-98.

- 107-MCKEON C., TRICHE T.J., KNUSTEN T.: Indistinguishable patterns of protooncogene expression in two distinct but closely related tumors: Ewings sarcoma and neuroepithelioma. *Cancer Res* 1988; 48:4307-4311.
- 108-STEINER G.C., GRAHAM S., LEWIS M.M.: Malignant round cell tumor of bone with neural differentiation (neuroectodermal tumor). *Ultrastruct Pathol* 1988; 12:505-512.
- 109-THIELE C.J., MCKEON C., TRICHJE T.J., ROSS R.A., REYNOLDS C.P., ISRAEL M.A.: Differential protooncogen expression characterizes indistinguishable tumor of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 1987; 80:804-811.
- 110-SWANSON P.E., DEHNER L.P., WICK M.R.: Small round cell tumors in children. A lectin histochemical and immunohistochemical analysis of 30 cases. *Surg Pathol* 1993; 5:5-16.
- 111-MIREAU G.W., FAVARA B.: Rhabdomyosarcoma in children: ultrastructural study of 31 cases. *Cancer* 1980; 46:2035-2040.
- 112-MORALES A., FINE G., HORN R.C.: Rhabdomyosarcoma: an ultrastructural appraisal. *Pathol Annu* 1972; 7:81-106.
- 113-NEWTON W.A., SOULE E.H., HAMONDI A.B.: Histopathology of childhood sarcomas: Inter-group rhabdomyosarcomas studies I and II: clinicopathological correlation. *J Clin Oncol* 1988; 6:67-75.
- 114-GARBEROGLIO C., DUDAS M.S., EPHAİM S.C., BERTINO J., CORDON-CARDO C.: Expression of P-glycoprotein in normal muscle cells and myogenic tumors. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116:1055-1061.
- 115-FLETCHER J.A.: Cytogenetic aberrations in malignant soft tissue tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 1991; 115: 235-246.
- 116-GERALD W.L., ROSAI J.: Desmoplastic small cell tumor with divergent differentiation. *Pediatr Pathol* 1989; 9:177-183.
- 117-GONZALEZ-CRUSSI F., CRAWFORD S.E., SUN C.J.: Intrabdominal desmoplastic small cell tumor with divergent differentiation. Observations of three cases of childhood. *Am J Surg Pathol* 1990; 14:633-642.
- 118-GONZALEZ-CRUSSI F., BAUM ES.: Renal sarcomas of childhood: a clinicopathologic and ultrastructural study. *Cancer* 1983; 51:989-912.
- 119-MALONE M. Soft tissue tumors in childhood. *Histopathology* 1993; 23:203-216.
- 120-NOVAK R.W., CACES J.N., JOHNSON W.W.: Sarcomatous renal tumors of childhood. An electron microscopic study. *Am J Clin Pathol* 1980; 73:622-625.
- 121-BARONI C.D., PESCARMONA E., CALOGERO A.: y col. B and T cell non Hodgkins lymphoma with large multilobulated cells; morphological, phenotypic and

- clinical heterogeneity. *Histopathol* 1987; 11: 1121-1132.
- 122-ROSAS-URIBE A., AVILA-MAYOR A., GARCÍA-TAMAYO J.: Micosis Fungoides Demblée (Linfoma cutáneo de linfocitos T) Estudio clinicopatológico, ultraestructural e inmunohistológico de tres pacientes. *Patología (Mex)* 1985; 21:125-142.
- 123-ROSAS-URIBE A., VARIKOJIS D., MOLNAR Z., RAPPAPORT H.: Mycosis fungoides: an ultrastructural study. *Cancer* 1974; 34:634-645.
- 124-MCDOWELL EM, TRUMP BF. Pulmonary small cell carcinoma showing tripartite differentiation in individual cells. *Hum Pathol* 1981; 12:286-294.
- 125-MIETTINEN M., LETHO V.B., VIRTANEN Y., ASKO SELJAVARA S. PITÄNEN J., DALH D.: Neuroendocrine carcinoma of the skin (Merkell cell carcinoma): ultrastructural and immunohistochemical demonstration of neurofilaments. *Ultrastruct Pathol* 1983; 4:219-225.
- 126-PILOTTI S., RILKE F., LOMBARDI L.: Neuroendocrine carcinoma (Merkell cell) of the skin. *Am J Surg Pathol* 1982; 6:243-254.
- 127-ORDOÑEZ N.G, XIALONG J., HICKEY R.C.: Comparison of HMB 45 monoclonal antibody and S-100 Protein in the immunohistochemical diagnosis of melanoma. *Am J Clin Pathol* 1988, 90:385-390
- 128-ZARBO R.J., GOWN A.M., NAGLE R.B., VISSHER V.W., CRIOSMAN J.D.: Anomalous cytokeratin expression in malignant melanoma: one and two dimensional Western blot analysis and immunohistochemical survey of 100 melanomas. *Modern Pathol* 1990, 3:494-501
- 129-SHEIBANI K., BATTIFORA H.: Signet ring melanoma. A rare morphologic variant of malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1988, 12:28-34
- 130-AVILA-MAYOR J., GARCÍA-TAMAYO J., DE RODRÍGUEZ B.: Carcinoma medular del tiroides. Estudio histológico, inmunocitoquímico y ultraestructural. *Invest Clin* 1982; 23:229-247.
- 131-GONZALEZ J.E., OVIEDO-AYALA N., CESPEDES G., GARCÍA-TAMAYO J.: Tumores intracra-neales primitivos de células germinales. Discusión de hallazgos clínicos y morfológicos en ocho casos. *Patología (Mex)* 1980; 18:37-56.