

Capítulo 2

Técnicas para el estudio de la patología

Para aprender la patología contemporánea de manera eficiente, resulta fundamental que el estudiante esté familiarizado con los diversos métodos de laboratorio, y con las técnicas y herramientas empleadas para el estudio de esta materia. Este capítulo se dedicará a los aspectos básicos de los métodos disponibles en los laboratorios modernos de patología –desde la microscopía básica–, hasta los métodos más recientes.

LA PATOLOGÍA EN LA AUTOPSIA

El profesor William Boyd escribió con su estilo inimitable: “La patología se inició en la camilla de autopsias”. La importancia de la autopsia para la patología se destaca en la inscripción en latín en una sala de autopsias, que significa: “Éste es el sitio donde la muerte ayuda a la vida”. Como se afirmó en el capítulo anterior, el italiano G. B. Morgagni (1682-1771) y el francés T. H. A. Laennec (1781-1826) comenzaron a coleccionar informes de casos hospitalarios y a relacionar las características clínicas con las lesiones observadas en las autopsias, de manera que establecieron la correlación clínico-patológica. Este método aún se mantiene como la forma más importante de enseñanza clínica en las instituciones médicas de todo el mundo.

El minucioso examen posmórtem le indica al médico la patogenia de la enfermedad, le revela los efectos nocivos de la terapia administrada y establece las discrepancias entre los diagnósticos previo y posterior a la muerte; aún no se ha hallado un sustituto para este método.

Hay dos métodos tradicionales para realizar una autopsia, que se pueden emplear de forma indistinta:

1. Extracción en bloque de los órganos abdominales y torácicos.
2. Disección in situ de cada órgano por separado.

Cuando se cree que varios órganos podrían estar comprometidos, se debe realizar una autopsia completa, pero si se sospecha una enfermedad de un órgano específico, una miniautopsia o una autopsia limitada podrían ser suficientes.

El estudio realizado durante la autopsia proporciona conocimientos y habilidades tanto al médico como al patólogo. Los *objetivos* principales de la autopsia son los siguientes.

1. *Evaluación de la calidad de la atención del paciente* mediante:
 - i) la confirmación de la causa de la muerte,
 - ii) el establecimiento del diagnóstico de certeza y
 - iii) el estudio de la respuesta terapéutica.
2. *Educación de todo el equipo* comprometido en la atención del paciente mediante:
 - i) el diagnóstico en la autopsia de trastornos que, a menudo, pasan inadvertidos en el examen clínico, como por ejemplo neumonía, embolia pulmonar, pancreatitis aguda, carcinoma de próstata;
 - ii) el descubrimiento de nuevas enfermedades en la autopsia, como por ejemplo síndrome de Reye, legionelosis (enfermedad de los legionarios), síndrome de dificultad respiratoria aguda grave;

iii) el estudio de la demografía y la epidemiología de las enfermedades y

iv) la educación de los estudiantes y el personal de patología.

La *reducción de la tasa de autopsia* en todo el mundo durante los últimos años se debe a las siguientes razones:

1. Diagnósticos más confiables gracias a los avances en las técnicas de diagnóstico por la imagen, como la tomografía computarizada (TC), la resonancia magnética (RM), la angiografía y otras.
2. Temor del médico frente a la responsabilidad legal por cometer un error.

La estimulación de la realización de autopsias a cargo de médicos y patólogos en hospitales de tercer nivel es fundamental para mejorar la atención de los pacientes y para el avance de la ciencia médica.

PATOLOGÍA QUIRÚRGICA

PERSPECTIVA HISTÓRICA

El término “patología quirúrgica” se aplica en la actualidad como sinónimo de histopatología, anatomía patológica, patología anatómica y patología celular. La patología quirúrgica es el método clásico y comprobado para el diagnóstico tisular basado en el examen macroscópico y microscópico de los tejidos.

Como se comentó, la patología quirúrgica inició el estudio patológico de los tejidos obtenidos en las autopsias. Los primeros cirujanos sólo dependían de los hallazgos quirúrgicos o macroscópicos y descartaban los tejidos resecaados sin aprovechar la oportunidad de realizar un diagnóstico microscópico. No obstante, con los avances tecnológicos realizados en la industria de los colorantes en los primeros años del siglo xx, se desarrolló la especialidad de la patología quirúrgica diagnóstica a través de la creación de la biopsia.

Al comienzo, esta tarea estaba a cargo de un miembro con experiencia del equipo quirúrgico en los departamentos de cirugía, que recibía el nombre apropiado de “patólogo quirúrgico”. En la actualidad, el campo de la anatomía patológica quirúrgica se expandió tanto que se desarrollaron varias subespecialidades, como nefropatología, neuropatología, hematopatología, dermatopatología, citopatología ginecológica, patología pediátrica y otras.

LA EXTENSIÓN Y LAS LIMITACIONES DE LA PATOLOGÍA QUIRÚRGICA

Los servicios de patología quirúrgica de cualquier hospital grande dependen, sobre todo, del material proporcionado por los cirujanos y los médicos familiarizados con la extensión y las limitaciones de la especialidad. En consecuencia, resulta fundamental que el médico se pueda comunicar con libertad con el patólogo, tanto de manera formal como informal, a través de formularios de patología quirúrgica, de forma verbal y en diferentes foros como reuniones y conferencias interdepartamentales.

FORMULARIOS. La primera tarea y la más importante del médico que solicita un diagnóstico tisular consiste en enviar un formulario completo con los datos de identificación del paciente, que deben coincidir con los del recipiente con la pieza. El formulario debe contener toda la información relevante sobre el caso y la enfermedad (anamnesis, hallazgos en el examen físico y en la cirugía, resultados de otras pruebas bioquímicas, hematológicas y radiológicas relevantes y diagnósticos clínicos y diferenciales) y referencias a exámenes citológicos o biopsias previas en los servicios de patología.

RECEPCIÓN DEL TEJIDO. El personal del laboratorio que recibe la pieza de la biopsia siempre debe controlar la identificación del paciente en el formulario y en el recipiente con la muestra. Para el procesamiento habitual de los tejidos con la técnica de inclusión en parafina, el tejido se debe introducir en una solución fijadora (con mayor frecuencia solución fisiológica y formol al 10% o formalina amortiguada al 10%) o se puede recibir en fresco sin fijar. Para el corte por congelación, el tejido siempre se transporta en fresco sin fijación. La fijación con microondas también se puede usar en el laboratorio para la fijación rápida y el procesamiento de piezas quirúrgicas.

EXAMEN MACROSCÓPICO. El examen macroscópico de la pieza recibida en el laboratorio es el paso siguiente más importante. El corte tisular macroscópico apropiado, la descripción macroscópica y la selección de una muestra representativa de tejido de una pieza más grande son partes esenciales del examen anatomopatológico del tejido remitido. Un error en este paso no puede resolverse en un estadio posterior, ya que podría requerir la separación de fragmentos de tejido en fresco en caso de que la pieza sea bastante grande y de que se pueda retrasar el transporte; o, si la biopsia es pequeña y se pierde en el procesamiento, será necesario realizar otra vez todo el procedimiento quirúrgico para obtener la biopsia.

Los laboratorios modernos para la evaluación macroscópica disponen de un sistema de grabación de la descripción macroscópica a través de un dictáfono sin la necesidad de un asistente que escriba el informe. Algunos laboratorios tienen un protocolo para la obtención de fotografías de la pieza macroscópica y radiografías de la muestra antes y después del corte del tejido para su documentación.

Los tejidos calcificados y el hueso se deben someter a descalcificación para eliminar los minerales y ablandar el tejido mediante su tratamiento con agentes descalcificantes, como ácidos y quelantes (con mayor frecuencia, ácido nítrico acuoso).

Resulta fundamental que todo el personal de la sala de examen macroscópico mantenga precauciones estrictas para la manipulación de los tejidos infectados con tuberculosis, hepatitis, HIV y otros virus.

EL LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA. Los bloques de tejido con su número de la sala de macroscopia se someten a los procedimientos del laboratorio. La mayoría de los departamentos de histopatología usa procesadores tisulares automáticos (Fig. 2.1) que cuentan con doce espacios separados para completar el ciclo durante la noche en aproximadamente dieciocho horas. Se describen a continuación:

- ◆ formalina al 10% para su fijación,
- ◆ grados ascendentes de alcohol (10, 95% hasta 100%) para su deshidratación durante cinco horas en 6 o 7 recipientes,
- ◆ xileno, tolueno y cloroformo para su limpieza en tres horas en dos recipientes e
- ◆ impregnación en parafina durante seis horas en dos baños de cera con termostato.



Figura 2.1 ◆ Procesador automático de tejido para el procesamiento mediante la técnica de inclusión en parafina. (Thermo Shandon, Reino Unido). Cortesía: Towa Optics (India) Pvt. Ltd., Nueva Delhi.

Para evitar la contaminación del laboratorio con formalina y alcoholes, también se dispone de procesadores tisulares por vacío con sistema cerrado.

La fijación del tejido se realiza en cera derretida, en bloques que se preparan con molde metálicos L (de Leuckhart). En la actualidad, también hay moldes plásticos de diferentes colores para constituir bloques con las diversas biopsias. Todo el proceso de fijar los tejidos y formar bloques se puede controlar a través de la temperatura; además, hay centros dedicados a la fijación de los tejidos (Fig. 2.2). Luego, los bloques se cortan después de su sección con micrótopo, con mayor frecuencia con un micrótopo rotatorio, que emplea bisturí fijo u hojas de bisturí desechables (Fig. 2.3).

El crióstato o el corte por congelación eliminan todos los pasos de procesamiento tisular y de inclusión en parafina. En cambio, el tejido se congela rápidamente con hielo a alrededor de -25°C –que actúa como medio de fijación–, y luego se secciona (Fig. 2.4). A continuación, los cortes quedan listos para su tinción. El corte por congelación es un procedimiento de diag-



Figura 2.2 ◆ Centro de inclusión tisular para la técnica de parafina (Histocentre). (Thermo Shandon, Reino Unido). Cortesía: Towa Optics (India) Pvt. Ltd., Nueva Delhi.



Figura 2.3 ♦ Micrótopo rotatorio para la sección de la pieza con la técnica de inclusión en parafina. (Thermo Shandon, Reino Unido). Cortesía: Towa Optics (India) Pvt. Ltd., Nueva Delhi.

nóstico intraoperatorio rápido que se puede llevar a cabo en los tejidos antes de avanzar a una cirugía radical mayor. Asimismo, también se usa para identificar algunos componentes que, en condiciones normales, se pierden durante el procesamiento en alcohol o xileno, como por ejemplo los lípidos, las enzimas y otros. Este procedimiento se puede realizar en el quirófano cerca de la camilla.



Figura 2.4 ♦ Crióstato para la realización de cortes mediante la técnica de congelación (Cryotones). (Thermo Shandon, Reino Unido). Cortesía: Towa Optics (India) Pvt. Ltd., Nueva Delhi.

Los cortes incluidos en parafina se tiñen de forma sistemática con hematoxilina y eosina (H & E). El material sometido a corte por congelación se puede teñir con H & E rápida o con azul de toluidina de manera habitual. Se pueden emplear tinciones especiales con cualquiera de los dos métodos de acuerdo con la necesidad. Los cortes se colocan en un portaobjetos y se envían al laboratorio para su estudio microscópico.

EL INFORME ANATOMOPATOLÓGICO. La última tarea, y la más importante del laboratorio de patología, es la elaboración de un informe rápido, preciso, breve y con relevancia pronóstica. El informe ideal debe contar con cinco elementos:

- Datos del paciente (disponibles para el patólogo, como el nombre del paciente).
- Descripción macroscópica precisa.
- Hallazgos microscópicos.
- Diagnóstico morfológico, que debe incluir el órgano con fines de clasificación con los códigos de SNOMED (Scientific Nomenclature in Medicine, Nomenclatura científica en medicina).
- Otros comentarios en algunos casos.

EL CONTROL DE CALIDAD. El control de la calidad de la información proporcionada por el laboratorio de histopatología es importante para detectar los resultados inadecuados, los procedimientos de actualización y los avances en los informes definitivos. Es posible implementar un control de calidad interno mediante discusiones mutuas en los casos controvertidos y la autoevaluación de la calidad de los cortes en el ámbito del laboratorio. En la actualidad, también se cuenta con programas de control de calidad externo de todo el laboratorio de histopatología.

EL HISTOPATÓLOGO Y LOS ASPECTOS LEGALES. En este momento, el problema de las demandas por negligencia y mala práctica en histopatología se equipara con el que acecha a otras disciplinas clínicas. En las biopsias y en los casos controvertidos, se pueden solicitar interconsultas internas y externas. Asimismo, la tarea responsable nunca se debe delegar, salvo que el superior sienta confianza de que su delegado tiene la suficiente experiencia y capacidad.

TINCIONES ESPECIALES (HISTOQUÍMICA)

Con la tinción de H & E, la hematoxilina tiñe los núcleos y la eosina se usa como contratinción para el citoplasma y varios materiales extracelulares. La tinción con H & E se emplea de forma habitual para diagnosticar mediante microscopía la gran mayoría de las piezas quirúrgicas. Sin embargo, en algunas circunstancias “especiales”, cuando el patólogo desea demostrar sustancias o componentes específicos de las células para confirmar constituyentes etiológicos, histogénicos o patogénicos, se pueden emplear tinciones especiales –también denominadas “tinciones histoquímicas”–. La tinción depende de las características físicas o químicas, o de la solubilidad diferencial entre la tinción y los tejidos. Los principios de algunos de los procedimientos de tinción se conocen de forma amplia, pero otros aún son desconocidos.

Algunas de las sustancias para las cuales hay tinciones especiales que se emplean con frecuencia en el laboratorio de patología quirúrgica son el amiloide, los hidratos de carbono, los lípidos, las proteínas, los ácidos nucleicos, el tejido conectivo, los microorganismos, los tejidos nerviosos, los pigmentos y los minerales; estas tinciones se enumeran en el **Cuadro 2.1**.

◆ CUADRO 2.1: Tinciones especiales (histoquímicas) usadas con mayor frecuencia en patología quirúrgica (en orden alfabético de los componentes)

Tinción	Componente/tejido	Colorantes	Interpretación
A. AMILOIDE			
1. <i>Rojo Congo con luz polarizada</i>	Amiloide	Rojo Congo	Birrefringencia verde: amiloide
2. <i>Azul de toluidina</i>	Amiloide	Azul de toluidina	Azul ortocromático: amiloide
B. HIDRATOS DE CARBONO			
3. <i>Ácido periódico de Schiff (PAS)</i>	Hidratos de carbono (en particular, glucógeno), todas las mucinas	Ácido periódico, reactivo de Schiff (fucsina básica)	Glucógeno y otros hidratos de carbono: magenta Núcleos: azul
4. <i>Mucicarmín/Carmín de Best</i>	Mucina ácida	Carmín	Mucina: rojo Núcleos: azul
5. <i>Azul alcian</i>	Mucina ácida	Azul alcian (a pH 2,5)	Mucina ácida: azul Núcleos: rojo
6. <i>Azul alcian-PAS combinados</i>	Mucina neutra	Azul alcian	Mucina ácida: azul Mucina neutra: magenta Núcleos: azul pálido
C. TEJIDOS CONECTIVOS			
7. <i>de Van Gieson</i>	Colágeno extracelular	Ácido pícrico, fucsina ácida, celeste azul hemalum	Núcleos: azul/negro Colágeno: rojo Otros tejidos: amarillo
8. <i>Tricrómico de Masson</i>	Colágeno extracelular	Fucsina ácida, ácido fosfomolibdénico, metil azul, celeste azul hemalum	Núcleos: azul/negro Citoplasma: músculo, células rojas: rojo Colágeno: azul
9. <i>Ácido fosfotúngstico-hematoxilina (PTAH)</i>	Músculo y filamentos gliales	Hematoxilina, ácido fosfotúngstico, permanganato, ácido oxálico	Estrías musculares, fibras neurogliales, fibrina: azul oscuro Núcleos: azul Citoplasma: rosa pálido
10. <i>Elástico de Verhoeff</i>	Fibras elásticas	Hematoxilina, cloruro férrico, yodo, yoduro de potasio	Fibras elásticas: negro Otros tejidos: contratinción
11. <i>de Gordon y de Sweet</i>	Fibras reticulares	Nitrato de plata	Fibras reticulares: negro Núcleos: negro o contratinción
D. LÍPIDOS			
12. <i>Aceite rojo O</i>	Lípidos (crióstato sin fijar)	Aceite rojo O	Aceites minerales: rojo Lípidos no saturados, fosfolípidos: rosa
13. <i>Sudán negro B</i>	Lípidos (crióstato sin fijar)	Sudán negro B	Lípidos no saturados: azul negro
14. <i>Tetróxido de osmio</i>	Lípidos (crióstato sin fijar)	Tetróxido de osmio	Lípidos no saturados: marrón negro Lípidos saturados: no teñidos
E. MICROORGANISMOS			
15. <i>de Gram</i>	Bacterias (cocos, bacilos)	Cristal violeta, yodo Lugol, rojo neutro	Grampositivas: queratina, fibrina: azul Gramnegativas: rojo
16. <i>de Ziehl-Neelsen</i>	Bacilos tuberculosos	Carbol fucsina, azul de metileno (diferencia en ácido-alcohol)	Bacilos tuberculosos, eje piloso, actinomicas: rojo Fondo: azul pálido
17. <i>Fite-Wade</i>	Bacilos de la lepra	Carbol fucsina, azul de metileno (decolorar en ácido sulfúrico al 10%)	Bacilos de la lepra: rojo Fondo: azul
18. <i>Metenamina de plata de Grocott</i>	Hongos	Tetraborato de sodio, nitrato de plata, metenamina	Hongos, <i>Pneumocystis</i> : negro Células rojas: amarillo Fondo: verde pálido
19. <i>Giemsa</i>	Parásitos	Polvo de Giemsa	Protozoos: azul oscuro Núcleos: azul
20. <i>Orceína de Shikata</i>	Antígenos de superficie de la hepatitis B (HBsAg)	Permanganato ácido, orceína, tetrazina	HBsAg positivo: marrón a negro Fondo: amarillo

Continúa

CUADRO 2.1: (Continuación) Tinciones especiales (histoquímicas) usadas con mayor frecuencia en patología quirúrgica (en orden alfabético de los componentes)

Tinción	Componente/tejido	Colorantes	Interpretación
F. TEJIDOS NERVIOSOS			
21. <i>Azul rápido de Luxol</i>	Mielina	Azul rápido de Luxol, violeta de cresilo	Mielina: azul/verde Células: violeta/rosa
22. <i>Plata de Bielschowsky</i>	Axones	Nitrato de plata	Axones y neurofibrillas: negro
G. PIGMENTOS Y MINERALES			
23. <i>Azul de Prusia de Perl</i>	Hemosiderina, hierro	Ferrocianuro de potasio	Hierro férrico: azul Núcleos: rojo
24. <i>Masson-Fontana</i>	Melanina, células argentafines	Nitrato de plata	Melanina, argentafín, cromafín, lipofucsina: negro Núcleos: rojo
25. <i>Rojo alizarin S</i>	Calcio	Rojo alizarin S	Depósitos de calcio: rojo naranja
26. <i>von Kossa</i>	Hueso mineralizado	Nitrato de plata, safranina O	Hueso mineralizado: negro Osteoide: rojo
27. <i>Ácido rubeánico</i>	Cobre	Ácido rubeánico	Cobre: negro verdoso Núcleos: rojo pálido
28. <i>Extracción de pigmento</i>	Eliminación del pigmento formalina y del pigmento de la malaria	Ácido pícrico alcohólico	Pigmento formalina/pigmento de malaria: eliminados
29. <i>de Grimelius</i>	Células argirófilas	Nitrato de plata	Gránulos argirófilos: marrón-negro
H. PROTEÍNAS Y ÁCIDOS NUCLEICOS			
30. <i>Reacción de Feulgen</i>	DNA	Metabisulfito de potasio	DNA: rojo púrpura Citoplasma: verde
31. <i>Metil verde pironina</i>	DNA, RNA	Verde de metilo, pironina Y	DNA: verde-azul RNA: rojo

HISTOQUÍMICA PARA LAS ENZIMAS

Las técnicas histoquímicas para las enzimas requieren tejido no fijado para poder cortarlo con el crióstato, y no se pueden aplicar en piezas fijadas en parafina o en formalina dado que las enzimas se dañan con rapidez. En la actualidad, la histoquímica para las enzimas tiene una utilidad diagnóstica limitada y no es tan popular; en parte, debido al requerimiento de tejidos frescos y a la técnica compleja y en parte, a causa de la escasez relativa de especificidad de la reacción en muchos casos. Esto determinó que las técnicas histoquímicas se reemplacen en la mayoría de los casos por procedimientos inmunohistoquímicos y técnicas de patología molecular.

En este momento algunas de las aplicaciones más frecuentes de la histoquímica para las enzimas en patología diagnóstica son para la identificación de enzimas relacionadas con el músculo (ATPasas) en las miopatías; acetilcolinesterasa, para el diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung; cloroacetato esterasa, para detectar células mieloides y mastocitos; reacción DOPA, para la actividad de la tirosinasa en los melanocitos; deshidrogenasa endógena (que requiere nitroazul de tetrazolio o NBT), para establecer la viabilidad del músculo cardíaco, y las fosfatasa ácida y alcalina.

MICROSCOPIA BÁSICA

El microscopio es la herramienta básica para el patólogo, de la misma manera que el estetoscopio lo es para el médico clínico y el espéculo para el ginecólogo. Este instrumento permite agrandar las imágenes de objetos diminutos.

MICROSCOPIA ÓPTICA. El tipo de microscopia usado con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos se denomina *microscopia óptica*. En general, hay dos tipos de microscopios ópticos:

Microscopio simple. Es una lupa que tiene una potencia magnificadora de entre 2× y 200×.

Microscopio compuesto. Posee una batería de lentes dispuestos en un instrumento complejo. Un tipo de lente permanece cerca del objeto (objetivo) y otro tipo se ubica cerca del ojo del observador (ocular). El ocular y el objetivo tienen distintas magnificaciones. El microscopio compuesto puede ser *monocular*, con un solo ocular, o *binocular*, con dos oculares (Fig. 2.5). Los *microscopios multicaberales* se usan en el ámbito de la enseñanza y con fines demostrativos.

VARIEDADES DE MICROSCOPIOS ÓPTICOS. Además de los microscopios ópticos, a continuación se describen otras modificaciones especiales para el laboratorio clínico:

Iluminación de campo oscuro. Este método se usa para el examen de microorganismos vivos no teñidos, como por ejemplo *Treponema pallidum*. Los microorganismos se iluminan con un haz de luz oblicuo que no atraviesa el microorganismo. El condensador se oscurece en el centro y la luz pasa a través de su periferia para iluminar el microorganismo vivo sobre un portaobjetos.

Microscopia de luz polarizada. Este método se usa para mostrar birrefringencia, p. ej., del amiloide, cuerpos extraños, pelos, etcétera. Se emite una luz polarizada plana. Tras atravesar un disco, los haces de luz vibran en un solo plano en ángulo recto



Figura 2.5 ♦ Microscopio óptico binocular (Modelo E 400, Nikon, Japón). Cortesía: Towa Optics (India) Pvt. Ltd., Nueva Delhi.

entre sí. Se colocan dos discos o prismas en la trayectoria de la luz: uno debajo del objeto denominado *polarizador* y otro en el tubo denominado *analizador*. El disco inferior se rota para que la luz quede polarizada en un plano.

INMUNOFLUORESCENCIA

La técnica de inmunofluorescencia se emplea para localizar moléculas antigénicas sobre las células en el examen microscópico. Este método se lleva a cabo mediante anticuerpos específicos que actúan contra la molécula antigénica para formar el complejo antígeno-anticuerpo en el sitio antigénico específico, que se visualiza gracias al empleo de un fluorocromo, el cual tiene la propiedad de absorber la radiación en forma de luz ultravioleta, de manera que quede dentro del espectro de la luz visible en el examen microscópico.

El método de inmunofluorescencia posee los siguientes componentes esenciales:

MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA. Se basa en el principio de que la radiación que emite la luz ultravioleta de menor longitud de onda –360 nm– o la luz azul –longitud de onda 400 nm– causa fluorescencia en ciertas sustancias y luego vuelve a emitir la luz con mayor longitud de onda.

♦ Algunas sustancias tienen fluorescencia natural, que se denomina *fluorescencia primaria* o *autofluorescencia*; aunque se requiere luz ultravioleta para observarlas mejor, como por ejemplo la vitamina A, la porfirina y la clorofila.

♦ La *fluorescencia secundaria* se emplea con mayor frecuencia y es la producción de fluorescencia a través del agregado de colorantes o compuestos químicos denominados “fluorocromos”.

Fuente de luz. El vapor de mercurio y las lámparas de gas xenón se usan como fuente de luz para la microscopía de fluorescencia.

Filtros. Hay varios filtros que se usan entre la fuente de luz y el objetivo: *en primer lugar*, el filtro que absorbe el calor; *en segundo lugar*, el filtro que detiene la luz roja y *en tercer lugar*, el filtro excitador que sólo permite el pasaje de la luz de la longitud de onda deseada. Al atravesar la pieza, se reúne tanto la luz excitadora como la que emite fluorescencia. La luz excitadora se elimina debido al pasaje por otro filtro llamado *filtro barrera*, ubicado entre el objetivo y el observador, que protege el ojo del observador para que sólo la luz fluorescente lo alcance.

Condensador. El condensador de campo oscuro se usa en el microscopio de fluorescencia para que la luz directa no caiga en el objeto y, en cambio, se cree un fondo de contraste oscuro para la fluorescencia.

TÉCNICAS. Hay dos tipos de técnicas de fluorescencia, ambas realizadas en criostatos sobre tejido no fijado, que se denominan directa e indirecta.

♦ En la *técnica directa* –presentada por Coons (1941), quien realizó el estudio original sobre inmunofluorescencia–, se dirige un anticuerpo conjugado con un fluorocromo contra un antígeno, y luego, el tejido se examina bajo microscopía óptica.

♦ En la *técnica indirecta*, también denominada “técnica sándwich”, se genera una interacción entre un antígeno tisular y un anticuerpo específico, seguida por el lavado y luego por el agregado de un fluorocromo para completar la reacción. La técnica de inmunofluorescencia indirecta se aplica para detectar autoanticuerpos en el suero del paciente.

APLICACIONES. Los métodos de inmunofluorescencia se aplican para realizar las siguientes tareas:

1. para la *detección de autoanticuerpos en el suero*, como los anticuerpos contra el músculo liso (SMA, por su sigla en inglés), anticuerpos antinucleares (ANA, por su sigla en inglés), anticuerpos antimitocondriales (AMA, por su sigla en inglés), anticuerpo microsómico tiroideo, etcétera;
2. en las *enfermedades renales*, para detectar depósitos de inmunoglobulinas, complemento y fibrina en varios tipos de enfermedades glomerulares mediante el corte por congelación, como se describirá en el Capítulo 22;
3. en *enfermedades de la piel*, para detectar depósitos de inmunoglobulina mediante el corte por congelación; en particular, en la unión dermoepidérmica y en la porción superior de la dermis, por ejemplo en la dermatosis ampollar (Capítulo 26);
4. para el estudio de los *marcadores de superficie de la célula mononuclear* con anticuerpos monoclonales;
5. y para el diagnóstico específico de *enfermedades infecciosas*, p. ej., en la hepatitis viral.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La microscopía electrónica, desarrollada en la década de 1930 en Alemania, experimentó modificaciones debido al agregado de nuevos conocimientos para la comprensión de la estructura y la función de las células normales y enfermas en el nivel de los orgánulos celulares. Sin embargo, en etapas más recientes, la difusión de la inmunohistoquímica diagnóstica en la patología quirúrgica limitó la aplicación de la microscopía electrónica a las siguientes áreas de la patología diagnóstica:

1. en las enfermedades renales, junto con la microscopía óptica y la inmunofluorescencia (Capítulo 22);
2. en la ultraestructura de los tumores de histogénesis incierta;

3. para el estudio subcelular de los macrófagos en enfermedades por depósito de sustancias;
4. y con fines de experimentación.

TIPOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Hay dos tipos principales de microscopía electrónica:

1. **Microscopía electrónica de transmisión.** Es la herramienta de elección para el estudio de la ultraestructura de la célula y sus orgánulos. Este estudio consiste en el pasaje de un haz de electrones a través de una sección ultradelgada de tejido. La magnificación obtenida oscila entre 2.000 y 10.000 veces.
2. **Microscopía electrónica de barrido.** Evalúa la estructura de la superficie celular y produce una imagen tridimensional. Por ejemplo, para observar los podocitos en el glomérulo renal.

Aspectos técnicos

A continuación se mencionan algunas de las consideraciones técnicas principales relacionadas con la microscopía electrónica:

1. **Fijación.** Siempre que se planee evaluar un tejido con microscopía electrónica, se debe fijar una lámina delgada y pequeña de tejido de no más de 1 mm de espesor en glutaraldehído amortiguado al 2% o al 4% o en una mezcla de formalina y glutaraldehído. Después de la fijación, el tejido se fija en una solución amortiguada de tetróxido de osmio para aumentar el contraste.
2. **Inclusión.** El tejido se incluye en resina, en una grilla.
3. **Cortes semidelgados.** En primer lugar, se realizan cortes semidelgados de un espesor de 1 μ m y se tiñen con azul de metileno o azul de toluidina. A veces, también se pueden cortar bloques de parafina para su estudio con microscopía electrónica; pero, en general, no son bastante satisfactorios debido a la existencia de numerosos artefactos. Los cortes semidelgados guían el diagnóstico diferencial y la selección del área que se debe analizar en los cortes ultradelgados.
4. **Cortes ultradelgados.** Para el examen ultraestructural, los cortes ultradelgados se realizan con un bisturí de diamante. Con el fin de aumentar la densidad electrónica, los cortes delgados se pueden teñir a través de la inmersión de la grilla en una solución de citrato de plomo y de acetato de urinilo.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica es la aplicación de técnicas inmunológicas a la patología celular. La técnica se emplea para detectar el estado y la localización de un antígeno específico en las células (membrana, citoplasma o núcleo) mediante el empleo de anticuerpos específicos, que luego se observan con un cromógeno de color marrón. De esta manera, se contribuye a la determinación del linaje celular específico o se puede confirmar una infección. La inmunohistoquímica revolucionó la patología diagnóstica –conocida como la “revolución marrón”– y, en muchos laboratorios sofisticados, esta técnica reemplazó a la histoquímica como procedimiento auxiliar. Además de los principios subyacentes a la inmunohistoquímica y a la histoquímica, estas dos técnicas se diferencian en el resultado final: la histoquímica produce diversos colores para los distintos componentes teñidos de acuerdo con la sustancia teñida, mientras que la inmunohistoquímica produce solamente en el sitio apropiado de la célula su característico color marrón como resultado final.

En la última década, se realizaron avances significativos en las técnicas inmunohistoquímicas. En la actualidad, es posible

emplear de forma habitual bloques de tejido procesados incluidos en parafina para realizar la inmunohistoquímica, lo que influye de forma significativa sobre el desarrollo de la patología quirúrgica diagnóstica. En el pasado, la patología quirúrgica diagnóstica se solía considerar una ciencia subjetiva con variaciones entre los observadores –en particular, en lesiones fronterizas y en lesiones de origen indeterminado– pero, el uso de la inmunohistoquímica agregó *objetividad, especificidad y reproducibilidad* al diagnóstico patológico quirúrgico.

Generalidades de la inmunohistoquímica

◆ La inmunohistoquímica surgió de los *métodos de inmunofluorescencia*, en los cuales los anticuerpos marcados con compuestos fluorescentes podían localizar un antígeno específico en el corte con criostato.

◆ La necesidad de microscopía de fluorescencia se evitó gracias al desarrollo subsiguiente de la *técnica de marcado enzimático con peroxidasa de rábano* con algún sistema colorigénico, en lugar de un fluorocromo; de manera que el corte por congelación con un anticuerpo marcado se puede observar con microscopía óptica. Los *cromógenos* empleados con mayor frecuencia en la reacción inmunohistoquímica son el tetracloruro de diaminobencidina (DAB, por su sigla en inglés) y el aminoetil carbazol (AEC, por su sigla en inglés), ambos para producir un producto final estable de color *marrón oscuro*.

◆ Luego, se desarrolló la técnica de inmunoperoxidasa, que emplea el método del anticuerpo marcado en *cortes de parafina fijados con formalina* y que, en la actualidad, se emplea con frecuencia.

◆ En la actualidad, los dos procedimientos empleados con mayor frecuencia en la inmunohistoquímica son los siguientes.

i) *Método de peroxidasa-antiperoxidasa* (PAP, por su sigla en inglés), que consiste en la generación del reactivo PAP en inmunocomplejos estables para su reacción con el anticuerpo primario mediante un anticuerpo intermedio.

ii) *Técnica inmunoenzimática con el conjugado avidina-biotina* (ABC, por su sigla en inglés), que consiste en el empleo de un anticuerpo secundario biotinilado para combinar el anticuerpo primario con un complejo grande preformado de avidina, biotina y peroxidasa.

◆ La selección del anticuerpo o los anticuerpos para la realización de tinciones inmunohistoquímicas se realiza tras el diagnóstico diferencial en cortes con H & E. En general, se prefiere un *panel de anticuerpos* sobre una sola prueba para evitar errores.

◆ Los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica se producen con *técnicas monoclonales (hibridoma)* y policlonales. La primera se emplea, sobre todo, para producir anticuerpos con afinidad elevada por un antígeno. En la actualidad, se dispone de un gran número de anticuerpos contra los antígenos celulares para su empleo en la inmunohistoquímica, y el listado tiende a aumentar de forma continua.

◆ Las tinciones inmunohistoquímicas siempre se deben asociar con los *controles positivos* apropiados; es decir, es un tejido que expresa un antígeno específico y que actúa como control, el cual puede ser un control interno o de otro tejido. La técnica del bloque tisular “en salchicha”, que se considera muy económica, combina la tinción de múltiples tejidos en un solo portaobjetos con un único procedimiento de control.

◆ Para la interpretación de los resultados de las tinciones inmunohistoquímicas, es importante recordar que *diferentes antígenos se localizan en distintos sitios de la célula* (membrana, citoplasma,

núcleo) y, en consecuencia, la tinción positiva se observa y se interpreta en esos sitios, como por ejemplo, tinción membranosa para el antígeno común leucocitario, tinción nuclear para los receptores de estrógeno y progesterona (RE-RP), tinción citoplasmática para la actina del músculo liso, entre otras.

◆ Las tinciones inmunohistoquímicas *no se pueden aplicar* para distinguir las lesiones neoplásicas de las no neoplásicas o los tumores benignos de los malignos. Estas distinciones se deben llevar a cabo mediante métodos tradicionales de patología quirúrgica.

Aplicaciones principales de la inmunohistoquímica

En la actualidad, las tinciones inmunohistoquímicas se emplean para los siguientes objetivos, que se enumeran en el orden de utilidad diagnóstica:

1. Tumores de histogénesis incierta. La inmunohistoquímica generó una revolución en el diagnóstico de los tumores de origen incierto, tanto primarios como metastásicos de un tumor primario desconocido. Se elige un conjunto de anticuerpos para resolver estos problemas con el diagnóstico; la selección de los anticuerpos se basa en la historia clínica, las características morfológicas y los resultados de otras investigaciones importantes. Son de gran utilidad los colorantes de inmunohistoquímica para teñir los *filamentos intermedios* expresados por las células tumorales (queratina, vimentina, desmina, neurofilamentos y proteínas ácidas fibrilares gliales), además de los enumerados en el **Cuadro 2.2**.

2. Marcadores de pronóstico para el cáncer. La segunda aplicación de la inmunohistoquímica en importancia es la predicción del pronóstico de los tumores a través de la identificación de las micrometástasis, las metástasis ocultas y con ciertas características adquiridas, de productos elaborados o genes expresados en exceso por las células malignas para establecer el

comportamiento biológico del tumor. A modo de ejemplo, se pueden mencionar los protooncogenes, como la expresión excesiva de HER-2/neu (carcinoma de mama), genes supresores tumorales o antioncogenes (p. ej., gen *Rb*, *p53*), receptores de factores de crecimiento (p. ej., receptor de factor de crecimiento epidérmico o EGFR) y marcadores de la proliferación de las células tumorales (p. ej., ki67, antígeno de proliferación nuclear celular PCNA). El análisis de los tumores mediante estos métodos representa un avance significativo en el manejo con respecto a los métodos convencionales para definir el pronóstico basados en la estadificación clínica y el grado histológico.

3. Predicción de la respuesta al tratamiento. La inmunohistoquímica se emplea de forma amplia para predecir la respuesta terapéutica en dos tumores importantes: carcinoma de mama y de próstata. El crecimiento de ambos tumores está regulado por hormonas: estrógenos y andrógenos, respectivamente. Los receptores específicos para estas hormonas que regulan el crecimiento se localizan sobre las células tumorales respectivas. Los tumores con alta positividad del receptor responden de manera favorable a la eliminación de la fuente endógena de estas hormonas –ooforectomía en el cáncer de mama positivo para estrógeno y orquiectomía en el carcinoma de próstata positivo para los andrógenos–. También se administra tratamiento hormonal para reducir sus niveles: estrogénoterapia, para el cáncer de próstata, y androgenoterapia, para el cáncer de mama. Los resultados de los receptores de estrógenos y de progesterona en el cáncer de mama presentan una correlación pronóstica significativa, aunque la utilidad pronóstica de los niveles de receptores de andrógenos en el cáncer de próstata es limitada.

4. Infecciones. Las tinciones inmunohistoquímicas se aplican en la actualidad para confirmar agentes infecciosos en los tejidos mediante el uso de anticuerpos específicos contra el DNA o el RNA microbiano, como la detección de virus –HBV, CMV, HPV, herpesvirus–, bacterias –p. ej., *Helicobacter pylori*– y parásitos –*Pneumocystis carinii*–, etcétera.

◆ CUADRO 2.2: Tinciones inmunohistoquímicas usadas con mayor frecuencia para los tumores de origen incierto.

Tumor	Inmunotinción
1. Tumores epiteliales (carcinomas)	i) Panqueratina (fracciones: queratinas de alto y bajo peso molecular, HMW-K, LMW-K) ii) Antígeno de la membrana epitelial (EMA) iii) Antígeno carcinoembrionario (CEA) iv) Enolasa neurooespecífica (NSE)
2. Tumores mesenquimáticos (sarcomas)	i) Vimentina (mesénquima en general) ii) Desmina (miogénico en generales) iii) Actina muscular específica (miogénico en generales) iv) Mioglobina (miogénicos esqueléticos) v) α 1-anti-quimiotripsina (para el histiocitoma fibroso maligno) vi) Factor VIII (para los tumores vasculares) vii) CD34 (marcador endotelial)
3. Grupos especiales	
a) Melanoma	i) HMB-45 (más específico) ii) Vimentina iii) S-100
b) Linfoma	i) Antígeno común leucocitario (LCA/CD45) ii) Pan-B (inmunoglobulinas, CD20) iii) Pan-T (CD3) iv) CD15, CD30 (marcador de las células RS para la enfermedad de Hodgkin)
c) Tumores neurales y neuroendocrinos	i) Neurofilamentos (NF) ii) NSE iii) GFAP (para los tumores gliales) iv) Cromogranina (para los neuroendocrinos) v) Sinaptofisina

CITOGÉNÉTICA

En el Capítulo 10 se describirán los aspectos aplicados de la citogenética. En este capítulo el comentario se centrará en breves consideraciones técnicas.

Las células somáticas humanas son diploides y contienen 46 cromosomas: 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales (XX en las mujeres y XY en los varones). Los gametos (espermatozoides y óvulos) contienen 23 cromosomas y se denominan *células haploides*. Todos los óvulos contienen 23 cromosomas (el sexual es X), mientras que los espermatozoides contienen 23 cromosomas (el sexual puede ser X o Y). En consecuencia, el sexo de la descendencia depende de la contribución cromosómica paterna, lo que implica que el óvulo fertilizado por un espermatozoide con un cromosoma X da como resultado un cigoto femenino, mientras que el óvulo fertilizado por un espermatozoide con un cromosoma Y produce un cigoto masculino.

Cariotipo

El cariotipo se define como la secuencia de cromosomas alineados de acuerdo con su tamaño, la localización del centrómero y el patrón de bandas. En el Capítulo 3, se describirá la estructura de los cromosomas.

La determinación del cariotipo de un individuo es una herramienta importante para el análisis citogenético. A continuación, se mencionan las características principales del cariotipo:

PATOLOGÍA DIAGNÓSTICA MOLECULAR

1. Selección de la célula. Las células capaces de crecer y dividirse son las seleccionadas para el análisis citogenético, como las células del líquido amniótico, las de una biopsia de vellosidades coriónicas, los linfocitos de la sangre periférica, las células de la médula ósea, de ganglios linfáticos, tumores sólidos, etcétera.

2. Cultivo celular. La muestra obtenida de esta manera se cultiva en un medio mitógeno. Un *mitógeno* es una sustancia que induce la mitosis en las células, como PPD, fitohemaglutinina (PHA, por su sigla en inglés), el mitógeno de la hierba carmín (PWM), éster forbol, etc. Luego, las células que se dividen, se detienen en metafase por el agregado de colchicina o colcemida: ambos son inhibidores de la formación de los microtúbulos. A continuación, las células se destruyen por el agregado de una solución hipotónica.

Luego, las células en metafase se fijan en una mezcla de metanol y ácido acético glacial.

3. Tinción/bandeo. Cuando se tiñen, los cromosomas forman bandas oscuras y claras alternadas. Para lograr este efecto, el preparado fijado en metafase se tiñe con una de las siguientes técnicas de bandeo:

- a) *Bandeo con Giemsa* o *bandeo G*, es empleado con mayor frecuencia.
- b) *Bandeo con quinacrina* o *bandeo Q*, empleado para mostrar las bandas a lo largo de los cromosomas.
- c) *Bandeo constitutivo* o *bandeo C*, se usa para mostrar la heterocromatina constitutiva.
- d) *Bandeo por tinción de Giemsa inversa* (o *bandeo R*), produce un patrón opuesto al obtenido con el bandeo G.

4. Análisis microscópico. Luego, los cromosomas se fotografían a través del examen microscópico del preparado. En la fotografía, los cromosomas se cortan y se organizan de acuerdo con su tamaño, su localización centromérica y sus patrones de bandeo. Los pares de cromosomas se identifican de acuerdo con la longitud del brazo de los cromosomas. El centrómero divide los cromosomas en un brazo superior corto denominado *brazo p* (la *p*, por *petit*, 'pequeño') y un brazo inferior largo denominado *brazo q* (la letra *q* es la que sigue a la *p*).

En la actualidad, se puede llevar a cabo el análisis citogenético molecular y la caracterización de los cromosomas a través de la técnica revolucionaria de hibridación in situ con fluorescencia multicolor (FISH, por su sigla en inglés) (véase más adelante en la sección de Patología molecular).

Aplicaciones

El campo de la citogenética posee amplias aplicaciones en patología diagnóstica (Capítulo 10). En resumen, el cariotipo se emplea para los siguientes fines:

- i) *Anomalías cromosómicas numéricas*, p. ej., síndrome de Down (trisomía del autosoma 21), síndrome de Klinefelter (trisomía 46), síndrome de Turner (monosomía 45, XO), abortos espontáneos.
- ii) *Anomalías cromosómicas estructurales*, como traslocaciones (p. ej., cromosoma Philadelphia t(9;22), síndrome de cri-du-chat, 5p, abortos espontáneos recurrentes), deleciones, inserciones, isocromosoma y formación de cromosoma anular.
- iii) El *cáncer* se caracteriza por múltiples anomalías cromosómicas complejas, como deleciones, amplificaciones, inversiones, traslocaciones, en especial en leucemias y linfomas, tumores de células germinales y algunos sarcomas.

Durante el último cuarto del siglo xx, se realizaron grandes avances en el campo de la biología molecular. Como consecuencia, las técnicas moleculares, que en el pasado sólo se empleaban con fines experimentales, ahora están disponibles para el diagnóstico. Estas técnicas sirven para detectar anomalías en el DNA o el RNA celular.

Por lo general, todas las técnicas moleculares basadas en el DNA o el RNA emplean la hibridación basada en la tecnología recombinante. Una región específica de DNA o RNA se detecta mediante su marcado con una sonda (la *sonda* es una cadena de nucleótidos formada por un número conocido de pares de bases). Las sondas poseen distintos tamaños y orígenes, y son las siguientes.

1. Las *sondas genómicas* provienen de una región del DNA de las células.
2. La *sonda de cDNA* se forma a partir de RNA mediante transcripción inversa.
3. La *sonda de oligonucleótidos* es una sonda sintética contraria al DNA genómico y a la sonda de cDNA, ambas derivadas de material celular.
4. Las *ribosondas* se preparan mediante un sistema de transcripción in vitro.

MÉTODOS MOLECULARES

A continuación, se presenta una descripción breve de las técnicas moleculares disponibles como herramienta de diagnóstico en la patología quirúrgica:

1. HIBRIDACIÓN IN SITU. La hibridación in situ es una técnica de hibridación molecular que permite la localización de una secuencia de ácido nucleico en forma directa en la *célula intacta* (o sea, in situ) sin la extracción del DNA, a diferencia de otras técnicas basadas en hibridación, que se describirán más adelante. Esta técnica consiste en la hibridación específica de una sola cadena de una sonda marcada de ácido nucleico con una sola cadena de un DNA o un RNA complementario de un tejido que se desea detectar. El producto final de la hibridación se identifica con una sonda radiactiva (^{32}P , ^{125}I) o no radiactiva (biotina, digoxigenina).

Aplicaciones. La hibridación in situ se usa en las siguientes aplicaciones:

- i) en *infecciones virales* (p. ej., HPV, EBV, HIV, CMV, HCV, etc.),
- ii) en *tumores humanos* para la detección de la expresión de genes y oncogenes.
- iii) en *trastornos cromosómicos*, en particular, mediante el uso de hibridación in situ por fluorescencia (FISH).

2. HIBRIDACIÓN CON FILTRO. Este método consiste en la extracción del DNA o del RNA evaluado del tejido, que puede ser fresco, congelado no fijado, o fijado en formalina e incluido en parafina. El DNA o el RNA extraído se inmoviliza en un filtro de nitrocelulosa o nailon. A continuación, se hibrida el DNA buscado con la sonda marcada. El análisis del DNA con hibridación por filtro se realiza a través de los siguientes métodos:

- i) *Ensayos de transferencia por manchas (dot) y por ranuras (slot)*, en los cuales la muestra de DNA se une de forma directa con el filtro sin reducción del tamaño del ácido nucleico.
- ii) *Southern blot (electroinmunotransferencia o inmunotransferencia)*; es similar a la anterior, pero difiere en el fraccionamiento previo del DNA mediante electroforesis en gel (se denomina *Southern blot*, debido al científico E. M. Southern, que describió esta técnica por primera vez).

iii) *Northern blot*; es similar a la anterior, pero con fraccionamiento del RNA. (En este caso se la ha llamado *Northern* como opuesta a la anterior, no corresponde a un apellido)

iv) *Western blot (electroinmunotransferencia de proteínas)*; es análoga a los dos métodos anteriores, pero para el fraccionamiento de proteínas; en este método, se usan anticuerpos como sondas.

Aplicaciones. Debido al nivel elevado de especificidad y sensibilidad de las técnicas de hibridación molecular, estos métodos se aplican de forma amplia en la patología diagnóstica.

i) *En las neoplasias*, tanto en las hematológicas como en las no hematológicas.

ii) *En las enfermedades infecciosas*, para el diagnóstico del agente causal, en estudios epidemiológicos y para la identificación de nuevos agentes infecciosos.

iii) *En las enfermedades genéticas hereditarias*, para detectar a portadores de mutaciones, para el diagnóstico prenatal y para el diagnóstico directo de las enfermedades genéticas.

iii) *En la determinación de la identidad*, para el trasplante de tejidos, en patología forense y para la evaluación del parentesco.

3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) es una técnica revolucionaria para la evaluación genética molecular con aplicaciones amplias en el diagnóstico y la investigación. La técnica se fundamenta en el *principio* de que una cadena de DNA posee una capacidad ilimitada para duplicarse a sí misma y así formar millones de copias. En la PCR, una sola cadena de DNA genera otra por la acción de la DNA polimerasa con un fragmento corto de DNA complementario y con el uso de un *cebador*, que actúa como molde para iniciar la reacción.

Un ciclo de la PCR consta de tres pasos:

i) *Desnaturalización del DNA con calor* (a 94 °C durante 60 a 90 segundos).

ii) *Hibridación* de los cebadores con sus secuencias complementarias (a 55 °C durante entre 30 y 120 segundos).

iii) *Extensión* de los cebadores hibridados con DNA polimerasa (a 72 °C durante entre 60 y 180 segundos).

Los ciclos se pueden realizar en un ciclador térmico automático, el cual produce una gran acumulación de la secuencia evaluada, dado que cada nuevo producto generado actúa como molde para el siguiente ciclo.

Aplicaciones. El análisis por PCR posee las mismas aplicaciones que las técnicas de hibridación con filtro, pero con muchos beneficios sobre ellas porque es más rápido, se pueden automatizar con cicladores térmicos y requiere mucho menos DNA inicial. Sin embargo, la PCR se puede contaminar; en consecuencia, se requiere precaución extrema durante la implementación de esta técnica.

OTRAS HERRAMIENTAS MODERNAS PARA LA PATOLOGÍA DIAGNÓSTICA

LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una herramienta moderna que se usa para el estudio de las propiedades de las células suspendidas en una corriente en movimiento. Por ende, la citometría de flujo supera el problema de la subjetividad asociada con el examen microscópico de las células y tejidos en la histopatología y en la citopatología.

El *citómetro de flujo* posee una fuente con luz láser para emitir fluorescencia, un sistema de transporte celular en una sola

corriente, filtros monocromáticos, lentes, espejos y un ordenador para el análisis de los datos. El citómetro de flujo actúa como clasificador de células, ya que distribuye en forma física las células presentes en la suspensión líquida, que fluyen en una sola hilera. La citometría de flujo requiere suspensiones unicelulares; y sus aplicaciones se limitan a la evaluación de líquidos, como por ejemplo leucocitos, eritrocitos y sus precursores, líquidos corporales y, en ocasiones, tejidos sólidos homogeneizados para crear suspensiones celulares.

Aplicaciones. El análisis por citometría de flujo se emplea en la práctica clínica para los siguientes casos.

1. *Inmunofenotipo*, a través del análisis antigénico detallado de varias neoplasias hematopoyéticas, como por ejemplo leucemias agudas y crónicas, linfomas (Hodgkin y no Hodgkin) y neoplasias de células plasmáticas.

2. *Medición de los antígenos asociados con la proliferación*, como por ejemplo Ki67, PCNA.

3. *Medición del contenido de ácido nucleico*, por ejemplo a través de la medición del contenido de RNA en los reticulocitos, la cuantificación del contenido de DNA y el recuento de la ploidía del DNA en varios tipos de cánceres.

4. *Diagnóstico y pronóstico de la inmunodeficiencia*, como por ejemplo en el síndrome de inmunodeficiencia humana o sida, a través del recuento de CD4 y de los linfocitos T. Los pacientes con recuentos de CD4 y linfocitos T menores de 500/mL requieren tratamiento antiviral.

5. *Para diagnosticar la causa del rechazo del aloinjerto* en un trasplante renal, en caso de nefropatía terminal a través del recuento de CD3 y linfocitos T. Los pacientes con recuentos de CD3 y linfocitos T menores de 100 a 200/mL tienen menor riesgo de experimentar un rechazo del injerto.

6. *Diagnóstico de autoanticuerpos* en la púrpura trombocitopénica idiopática y en la neutropenia autoinmunitaria.

MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Además de la citometría de flujo, el grado de proliferación de las células en los tumores se puede determinar a través de varios otros métodos, que se mencionan a continuación:

1. **Recuento mitótico.** Es el método más antiguo, pero aún se utiliza para el diagnóstico anatomopatológico sistemático. Se cuenta el número de células en mitosis por campo de gran aumento, como por ejemplo para clasificar varios tipos de tumores del músculo liso.

2. **Autorradiografía.** Este método consiste en el marcado in vitro con timidina de las células en vías de proliferación para después procesarlas para su inclusión en parafina. Las células marcadas con timidina (que corresponden a la fase S) se cuentan cada 2.000 núcleos de células tumorales y se expresan mediante el índice de marcación con timidina. El método se emplea como marcador pronóstico en el carcinoma de mama.

3. **Análisis microespectrofotométrico.** El fragmento se tiñe con la reacción de Feulgen para revelar el contenido de DNA en la célula y medir este contenido con un microespectrofotómetro. El método es tedioso y su aplicación es limitada.

4. **Inmunohistoquímica.** El antígeno nuclear específico para el crecimiento y la división celular se tiñe con inmunohistoquímica y luego se cuentan las células positivas con el microscopio o con un analizador de imágenes. Los marcadores de la proliferación, evaluados con este método, son Ki-67, PCNA y ciclinas.

5. **Región organizadora del nucleolo (NOR**, por su sigla en inglés). El nucleolo contiene componentes ribosómicos que se forman en regiones de los cromosomas con DNA denominadas "NOR". Estas áreas revelan afinidad por el metal plata. Esta propiedad se usa para la tinción del fragmento con plata (técnica AgNOR). Las NOR se presentan como manchas intranucleares de color negro, mientras que el fondo se tiñe de amarillo-amarronado.

ORDENADORES EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA

Un laboratorio de patología debe comunicar gran cantidad de información a los médicos. El patólogo también debe poder acceder a los datos del paciente antes de informar los resultados de las muestras recibidas. En consecuencia, resulta fundamental que el laboratorio de patología moderno posea un sistema informático que esté conectado con el sistema informático hospitalario.

Asimismo, el personal del laboratorio y los médicos deben conocer los sistemas utilizados.

El empleo de ordenadores en el laboratorio posee dos objetivos principales:

- ◆ para *registrar* los resultados de los pacientes y
- ◆ para *informar* los resultados de las pruebas en formato numérico, narrativo y gráfico.

Aplicaciones. La aplicación de ordenadores en el laboratorio de patología posee varias ventajas que se describen a continuación.

1. El personal del laboratorio y del hospital tienen acceso a la información del paciente, lo que ayuda a *mejorar su atención*.
2. El *tiempo entre la obtención de la muestra y el informe de los resultados* se abrevia.
3. *Mejora la productividad* del personal del laboratorio en todos los niveles, y este personal se puede utilizar en otras tareas.
4. *Codificación y clasificación* de los resultados y los datos de las distintas pruebas.
5. Con *finés de experimentación* y de *acreditación*, para obtener becas para la investigación, se requieren datos computarizados de los resultados.
6. *Almacenamiento y recuperación de los datos del laboratorio* para ahorrar el tiempo y el espacio ocupado por los archivos.

SISTEMA DE RECONOCIMIENTO DE VOZ. En la actualidad, hay sistemas computarizados que pueden reconocer la voz y transformar en texto las descripciones macroscópicas y microscópicas verbales de los informes a través de un dictáfono, sin que intervenga un secretario.

ANALIZADOR DE LA IMAGEN Y DE LA MORFOMETRÍA

La patología es una disciplina muy visual; por lo tanto, el análisis de las imágenes microscópicas representa el elemento principal para su estudio. Existe la necesidad y el deseo de impartir mayor objetividad a los informes de histopatología, ya que éstos solían ser bastante subjetivos. En la actualidad, mediante los avances en las técnicas de computación, se lograron mediciones objetivas de las características microscópicas cuantitativas para permitir la reproducibilidad de las observaciones histopatológicas.

El analizador de imágenes es un sistema que se utiliza para definir las características estructurales, celulares y nucleares de las células. En forma sucinta, el analizador de imágenes consiste en las siguientes partes:

1. microscopio óptico convencional con una cámara de vídeo montada sobre él.

2. un sistema computarizado (CPU, monitor, teclado, *mouse*, etc.) conectado con el microscopio.
3. un equipo de captura de imágenes que convierte las imágenes de vídeo del monitor en imágenes digitales y las almacena en la CPU.
4. soporte informático para el análisis de las imágenes instalado en el ordenador de acuerdo con las necesidades del usuario para realizar las mediciones y los cálculos.

APLICACIONES. El analizador de imágenes se puede usar con diversos objetivos, que se mencionan a continuación.

1. *Estudio morfométrico* de las células tumorales a través de la medición de las características estructurales, celulares y nucleares.
2. Medición *cuantitativa* de la *ploidía del DNA nuclear*.
3. Valuación cuantitativa de la *tinción inmunohistoquímica*.

LAS MICROMATRICES DEL DNA

La micromatriz del DNA es la aplicación más nueva de la tecnología con chips de siliconas para el análisis simultáneo de grandes volúmenes de datos de genes humanos, como por ejemplo para la detección y la cuantificación de mutaciones puntuales y pleomorfismos de un nucleótido único. El método elimina el uso de sondas de DNA. En su lugar, se usa el marcado fluorescente de un fragmento de DNA (cDNA o complementario), para la hibridación de la muestra en estudio. Se utilizan escáneres láser de alta resolución para la detección de las señales fluorescentes emitidas, mientras que el nivel de expresión de genes y el genotipo de las muestras biológicas se determinan a través de la aplicación de la bioinformática.

APLICACIONES. Las micromatrices de DNA se usan para obtener perfiles moleculares de los tumores que ayudan a arribar a diagnósticos histogenéticos específicos y a establecer el pronóstico.

MICRODISECCIÓN CON LÁSER

La microdissección con láser es otra técnica nueva en la patología quirúrgica diagnóstica que permite definir el perfil molecular del material tisular. Consiste en la disección de una sola célula o parte de una célula –p. ej., cromosomas– a través de tecnología láser y soporte informático apropiado para el procedimiento. Luego, el material aislado se puede usar para realizar las pruebas moleculares disponibles.

LA TELEPATOLOGÍA Y LA MICROSCOPIA VIRTUAL

La *telepatología* se define como la práctica de la patología diagnóstica a cargo de un patólogo presente en otro sitio a través de imágenes de las muestras tisulares transmitidas mediante una red de telecomunicaciones. Los *componentes* principales de un sistema de telepatología son los siguientes:

- ◆ microscopía óptica convencional;
- ◆ método para la captura de la imagen; en general, una cámara montada sobre el microscopio óptico;
- ◆ conexión de telecomunicaciones entre el lado emisor y el receptor;
- ◆ y una base operativa en el extremo receptor con un monitor de alta calidad.

De acuerdo con la necesidad y el presupuesto, el sistema de telepatología puede ser de dos *tipos*:

- ◆ *Estático (almacenamiento y transmisión, telepatología pasiva)*: consiste en la captura de imágenes específicas, su almacena-

miento y su transmisión a través de un correo electrónico, un protocolo de transferencia de archivos, un sitio web o CD-ROM. El método es bastante económico y se usa con mayor frecuencia, pero tiene la desventaja de que el emisor es el que selecciona las imágenes transmitidas.

◆ **Dinámico (telepatología interactiva con robot):** consiste en imágenes transmitidas en tiempo real desde un microscopio distante. El movimiento robótico del microscopio se controla a distancia, se adjuntan las imágenes y los campos elegidos procedentes de un servidor a distancia o local. En consecuencia, este método casi duplica la perfección del examen de los portaobjetos bajo el microscopio; se denomina *microscopia virtual*. Sin

embargo, la calidad de la imagen y la velocidad de Internet pueden ser obstáculos importantes.

La era de la *patología digital* en el siglo XXI alcanzó su cenit con la disponibilidad de la tecnología para preparar *piezas de patología virtuales* con equipos de alta velocidad y con el almacenamiento de datos en ordenadores con gran capacidad de memoria. Estas piezas almacenadas en la memoria del ordenador se pueden examinar e informar sin la necesidad de usar un microscopio. No obstante, la pregunta principal es si los patólogos actuales, acostumbrados a la microscopia convencional, lograrán la misma percepción en el monitor. En la actualidad, esta tecnología es útil para la enseñanza, las reuniones clínicas y el control de calidad.

