

35.1. Introducción.

Un microscopio electrónico usa electrones en lugar de fotones o luz visible para formar imágenes de objetos diminutos. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar ampliaciones mayores antes que los mejores microscopios ópticos, debido a que la longitud de onda de los electrones es bastante menor que la de los fotones "visibles".

El primer microscopio electrónico fue diseñado por Ernst Ruska y Max Knoll entre 1925 y 1932, quienes se basaron en los estudios de Louis-Victor de Broglie acerca de las propiedades ondulatorias de los electrones.

Limitaciones del microscopio electrónico:

1. La limitada apertura no permite que la información detallada alcance la imagen, limitando de este modo la resolución.
2. El contraste de amplitud (que radica en la naturaleza corpuscular de los electrones) se debe al contraste de difracción, provocado por la pérdida de electrones del rayo. Es un contraste dominante en especímenes gruesos.
3. El contraste de fase (que radica en la naturaleza ondulatoria de los electrones) se debe al contraste de interferencia provocado por los desplazamientos en las fases relativas de las porciones del rayo. Es un contraste dominante en especímenes finos.
4. Existen también distintas aberraciones producidas por las lentes: astigmática, esférica y cromática
5. El problema de la función de transferencia de contraste (CTF): la CTF describe la respuesta de un sistema óptico a una imagen descompuesta en ondas cuadráticas.

La aplicación de la microscopía electrónica (ME) en Anatomía Patológica ha experimentado un notable descenso en las últimas décadas. Ello se ha debido a la aparición de otras técnicas, como la inmunohistoquímica, en apariencia más sencillas y económicas, y sin duda aplicables de manera más generalizada en la mayor parte de laboratorios. En este contexto, se ha tendido a omitir el uso de la ME en situaciones en las que es de gran utilidad e incluso, en ciertos casos, es la principal o la única técnica que permite efectuar un determinado diagnóstico.

Existen todavía bastantes centros dotados de equipos de ME. En el ámbito sanitario, los servicios de Anatomía Patológica con un entorno académico de una cierta envergadura suelen contar con un laboratorio de ME. Suele tratarse de hospitales que disponen de centro de investigación o asociados a instituciones universitarias. En dos encuestas recientes, una de ellas de carácter general y otra centrada en patología renal, se ha identificado que

unos 25 servicios de Anatomía Patológica de España tienen disponibilidad de un microscopio electrónico, en ocasiones adscrito a la Universidad correspondiente y casi siempre en buen estado de funcionamiento. No obstante, en las dos últimas décadas, han desaparecido algunos de estos laboratorios. Las causas de ello han sido el envejecimiento y la imposibilidad de reposición del equipo, la falta de recursos económicos para su mantenimiento, la priorización de otras inversiones y la falta de personal técnico o de patólogos jóvenes con formación en este campo. En cambio, las unidades de ME que siguen en activo lo son porque el Servicio de Anatomía Patológica dispone de personal cualificado y entrenado y porque se destinan recursos para su mantenimiento.

Para la óptima rentabilización de un laboratorio de ME, es ideal que se reciban los estudios ultraestructurales de otros hospitales de su entorno, además de implicarse en la docencia y la investigación. En este sentido, una apuesta estratégica que cabe plantearse es la creación de una red de laboratorios de referencia de ME que presten servicio en su entorno y que estén coordinados entre sí.

Los resultados de mejor calidad en M.E. se obtienen en muestras jadas en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato o en solución de Karnovsky. Las muestras deben obtenerse en el menor plazo de tiempo posible desde la extracción del tejido, minimizando la compresión y evitando la desecación. Hoy en día, es frecuente que la necesidad de efectuar un estudio ultraestructural de un caso se detecte cuando ya la muestra está jada en formol o incluida en parafina. Este hecho no impide llevar a cabo el estudio y, aunque con menor calidad de imagen y con una variable pérdida de información, puede obtenerse datos de gran valor diagnóstico incluso en este tipo de muestras. En esta situación, los mejores resultados dependen también de la inmediatez de la fijación previa en formol, de la calidad del fijador, del tiempo de fijación, de la temperatura de la parafina y del tiempo de permanencia en la misma.

La mayor parte de muestras son fragmentos sólidos, pero pueden procesarse también sangre y otros líquidos, como el ascítico o el pleural, muestras de citología por aspiración con aguja fina, muestras de cepillado bronquial o nasal, etc.

El hecho de que el proceso técnico y el examen al microscopio electrónico sigan un curso distinto que el resto de muestras, unido al hecho de que en general se concentra la inclusión entre uno y dos días a la semana y cada quince días, hacen que a menudo los resultados de la ME se demoren más allá de lo deseable. Aun así, los resultados pueden ser de gran trascendencia para el diagnóstico y el tratamiento. No obstante, debe tenderse a mejorar los

tiempos de respuesta. Es relativamente sencillo, sin grandes ajustes técnicos, disponer de resultados en el plazo de una semana. Por otro lado, en función de la urgencia y las necesidades, es posible tener las muestras preparadas para estudio en una semana y, si es muy necesario, en 24-36 horas. De hecho, existen métodos de procesado rápido que permiten obtener cortes a las 4-6 horas de la llegada del tejido al laboratorio. Un importante factor limitante es la disponibilidad de tiempo por parte del patólogo.

La centralización de los laboratorios de ME permitiría destinar un patólogo al diagnóstico ultraestructural. También podría mejorar la dinámica al incorporar a los técnicos a la observación de casos al ME y la obtención de series de imágenes representativas para ser valoradas posteriormente por el patólogo responsable.

35.2. Microscopía electrónica. Tipos.

Existen dos tipos principales de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de transmisión y el microscopio electrónico de barrido.

35.2.1. Microscopio electrónico de transmisión (MET).

El microscopio electrónico de transmisión emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto cuya imagen se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan contra la Pared celular o son absorbidos por los ribosomas y otros lo atraviesan la Membrana plasmática, formando una imagen aumentada de la muestra. Para utilizar un microscopio electrónico de transmisión debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de unos 2000 ángstroms. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar la imagen de un objeto hasta mil veces.

35.2.2. Microscopio electrónico de barrido (MEB).

En el microscopio electrónico de barrido (MEB) la muestra es recubierta con una capa de metal delgado, y es barrida con electrones enviados desde un cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectados en una imagen de TV. Su resolución está entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio. Permite obtener imágenes de gran resolución en materiales pétreos, metálicos y orgánicos. La luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando la superficie.

35.3. Equipamiento y procesamiento de muestras.

El procesado del material biológico para Microscopía Electrónica presenta dos problemas fundamentales: el entorno de vacío y la transferencia de

energía. Para resolverlos, se utilizan distintas técnicas dependiendo del tamaño de la muestra.

1. Para muestras grandes como órganos, tejidos o células, se utilizan tres técnicas:
 - a. La fijación química o la criofijación.
 - b. La inclusión en resinas (criosustitución).
 - c. La réplica metálica.
2. Para muestras pequeñas como complejos macromoleculares se utilizan las siguientes técnicas:
 - a. La tinción negativa: los agentes de tinción más usados son el molibdato amónico, el fosfotungstato sódico y sales de uranio como acetato y formiato. Todos ellos presentan las siguientes propiedades: interactúan mínimamente con la muestra y son estables en la interacción con los electrones, son altamente solubles en agua, presentan una alta densidad que favorece el contraste, tienen un punto alto de fusión, tienen un tamaño de grano pequeño.
 - b. La réplica metálica: para construir la réplica metálica se evapora el metal (estaño), que se deposita sobre la muestra a la vez que esta, por el vacío, se disuelve.
 - c. La criomicroscopía.

Como la imagen que se forma en el TEM depende de que los electrones puedan atravesar la muestra, ésta ha de ser suficientemente delgada para permitirlo. Todas las técnicas de preparación, tanto de muestras materiales como biológicas, persiguen el objetivo de adelgazar o conseguir secciones muy finas del espécimen, menores a 100 nm., afectando al mínimo su estructura original.

35.3.1. Preparación de muestras biológicas para el TEM.

En general, la preparación de estas muestras siempre sigue el mismo protocolo básico: fijación química, lavado, deshidratación en series de concentraciones crecientes de alcohol o acetona, inclusión en resina y polimerización. Según el objetivo perseguido, en alguno de estos pasos se incluye una etapa de tinción con metales pesados, tales como el osmio, el wolframio o el uranio.

La siguiente etapa consiste en obtener cortes muy finos del material polimerizado.

Para ello se utiliza un ultramicrotomo.

35.3.2. Preparación de muestras para el microscopio de barrido.

Las muestras deben cumplir dos condiciones: deben estar secas y ser conductoras. El proceso de secado ha de llevarse a cabo preservando al máximo la estructura original de la muestra. Para ello tenemos dos alternativas: usar el método clásico de fijación y deshidratación química o utilizar el moderno método de fijación física por criofijación.

En ambos casos la muestra necesita recubrirse después con un material que la haga conductora y permita su observación en el microscopio.

Recubrimiento de muestras en bajo vacío: Con este método se realizan dos tipos de recubrimientos: “sputtering” de oro para obtener las mejores condiciones de imagen y, si se requiere microanálisis por rayos X, el recubrimiento por hilo de carbono.

Recubrimiento de muestras en alto vacío: Sus aplicaciones van más allá de la necesidad de obtener una muestra conductora para el SEM. Consigue recubrimientos de grano mucho más fino y está preparado para realizar “sputtering” con distintos metales. También trabaja por el método de evaporación, con lo que aumenta el rango de posibles elementos de recubrimiento. Utiliza electrodos de carbono para evaporarlo y obtener “films” que recubren las rejillas destinadas al TEM.

Observación de muestras criofijadas: El microscopio electrónico de barrido puede dotarse de un sistema capaz de observar la muestra a muy baja temperatura de forma que su preservación estructural es máxima y la capacidad de trabajo del microscopio no se afecta en absoluto, pues ya no tratamos con una muestra hidratada sino congelada.

Este proceso se inicia fuera del microscopio, enfriando la muestra a la máxima velocidad posible mediante nitrógeno nieve. A continuación, ya pasa al sistema de criobservación, donde se puede fracturar, sublimar el hielo superficial y recubrir con oro o carbono para su observación y/o análisis. La ventaja de este sistema es que se puede observar cualquier muestra biológica o hidratada con una preparación mínima y rápida con una buena preservación estructural.

35.4. Utilidad de la microscopía electrónica en la Anatomía Patológica actual.

Existen muchas situaciones en las que puede aplicarse la ME para mejorar la precisión de un diagnóstico. A continuación, se resumen algunas de las más importantes.

1. Enfermedades renales:
 - a. Nefropatía de cambios mínimos y otras podocitopatías.
 - b. Enfermedades de la membrana basal (membrana basal na, enfermedad de Alport).

- c. Glomerulonefritis en fases iniciales (mesangial, membranosa, membranoproliferativa, en especial por depósitos densos, Goodpasture, enfermedad de las cadenas ligeras, MAT, etc).
- d. Glomerulopatías con depósitos estructurados, en especial, en fases iniciales (amiloidosis, brilar, inmunotactoide, etc).
- e. Clasificación precisa de la afección glomerular en el lupus eritematoso.
- f. Patología glomerular del trasplante y multilaminación de membranas basales de los capilares peritubulares.
- g. Casos sin glomérulos disponibles en el material para inmunofluorescencia directa.
- h. Tubulopatías hereditarias mitocondriales.
- i. Enfermedades del cilio y del flagelo Se prefiere, para las primeras, una muestra obtenida de mucosa nasal con un cepillo de cepillado bronquial. La muestra debe ser profunda y debe evitarse obtenerla si el paciente presenta síntomas o signos de infección. Los flagelos de los espermatozoides pueden investigarse de modo similar en estudios de esterilidad. Se ha descrito ya una serie de alteraciones moleculares asociadas con pérdida de alguna de las estructuras del citoesqueleto ciliar, en particular la pérdida de uno o los dos brazos de dineína. Si bien existen pruebas funcionales como el NO o el examen de movilidad ciliar en fresco (in vivo/ ex vivo), el diagnóstico de discinesia ciliar primaria sigue siendo ultraestructural y puede corroborarse por estudios moleculares.

2. Enfermedades neuromusculares:

- a. Miopatía mitocondrial.
- b. Miopatías congénitas (nemalínica, enf. de cores centrales, miopatía miotubular).
- c. Miositis con cuerpos de inclusión.
- d. Miopatías mio brilares (desminopatías, miotilinopatías, asociadas a ZASP, etc).
- e. Distrofia muscular oculofaríngea.
- f. Miopatías metabólicas (glucogenosis y por acúmulo de lípidos: Fabry, Danon, etc).
- g. Neuropatías axonales, desmielinizantes y mixtas.
- h. Neuropatía tomacular.

3. Biopsias cerebrales:
 - a. Enfermedad de Whipple.
 - b. Ceroidlipofuscinosis
4. Biopsias de miocardio:
 - a. Miocardiopatías hipertróficas.
 - b. Miocardiopatías Tóxicas (Cloroquina, etc,)
5. Patología hepática:
 - a. Enfermedades por depósito: Enfermedad de Lafora, glucogenosis.
 - b. Inducidas por fármacos, cianamida, antabús.
6. Patología cutánea:
 - a. Epidermolisis ampollosas congénitas.
 - b. Epidermolisis ampollosa adquirida.
 - c. Alteraciones de bras colágenas y elásticas (cutis laxa, Ehlers-Danlos, etc).
 - d. Ictiosis.
 - e. CADASIL.
7. Enfermedades de depósito. Además de la piel, se estudian en ocasiones otros tipos de muestras (músculo, nervio).
8. Patología infecciosa:
 - a. Distinción entre artefactos y micoorganismos (p.e. en núcleos claros esmerilados).
 - b. Identificación y clasificación taxonómica de virus en pequeñas cantidades.
 - c. Identificación de protozoos: Microsporidio, Criptosporidio, Isospora, Toxoplasma, Leishmania, etc, en especial cuando son escasos o pueden simular cuerpos apoptóticos.
 - d. Identificación de bacterias en situaciones especiales como la espiroquetosis intestinal, la enfermedad de Whipple o la angiomatosis bacilar.
 - e. Control de la repuesta al tratamiento de estas infecciones.
9. Estudio inicial de orientación diagnóstica para indicar técnicas moleculares o inmunohistoquímicas específicas.

10. Patología tumoral.

- a. en las siguientes situaciones generales
 - i. Casos con resultados contradictorios en la inmunohistoquímica.
 - ii. Casos con inmunohistoquímica pobre (p.e. sólo vimentina) o con marcadores diagnósticos muy escasos no detectables por inmunohistoquímica (melanosomas, gránulos neuroendocrinos, sarcómeras, desmosomas, etc).
 - iii. Casos de fenotipo incierto o indiferenciados en el estudio con el microscopio óptico.
 - iv. Como control de calidad en casos ya diagnosticados.
- b. Diagnósticos diferenciales con criterios ultraestructurales útiles:
 - i. Mesotelioma-adenocarcinoma.
 - ii. Tumores de células acinares (páncreas, glándula salival).
 - iii. Tumores de células pequeñas: rhabdomyosarcoma, carcinoma de células pequeñas, tumor de Ewing.
 - iv. PNET, tumor desmoplásico de células redondas.
 - v. Carcinoma de células “no pequeñas” de pulmón: identificación de diferenciación glandular.
 - vi. Tumores con diferenciación mioepitelial y miofibroblástica.
 - vii. Tumores neuroendocrinos, neuroectodérmicos o neuroblásticos.
 - viii. Tumores de células secretoras de esteroides.
 - ix. Tumores eosinofílicos renales: oncocitoma vs. carcinoma cromóforo, carcinoma de células claras o carcinoma cromofílico papilar.
 - x. Tumores epitelioides de tejidos blandos: sarcoma sinovial, sarcoma epitelioides, sarcoma alveolar de partes blandas, tumores vasculares epitelioides.
 - xi. Cordomas y condrosarcomas.
 - xii. Tumores con diferenciación melanocítica: melanoma, angiomiolipoma epitelioides, tumores pigmentados de tejidos blandos y de sistema nervioso central.
 - xiii. Tumores ependimarios, meníngeos y neuronales del sistema nervioso.