

METODOS DE ESTUDIO EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

Dra. Leonor Moyano Schlegel
Hospital Clínico Universidad de Chile

La anatomía patológica es hoy una ciencia que estudia las enfermedades desde la morfología hasta la biología molecular. En el recorrido de su historia nace con los estudios anatómicos de Grecia y Roma sin embargo la visión que deben tener hoy es el de una especialidad de gran importancia en la comprensión de la enfermedad, su diagnóstico y tratamiento.

Marco Histórico;

- En la antigüedad en Grecia y Roma pocos tenían la oportunidad de realizar disecciones de cuerpos humanos a pesar de no existir restricciones.
- A partir de la edad media la tradición le confiere a los reyes la autoridad de autorizar la disección por el bien público, de un encarcelado vivo, mientras mantuviese su respiración.
- El cuerpo y alma del hombre una vez muerto le pertenecía a Dios.
- Los "médicos" eran sometidos a ritos de purificación.

- En el Renacimiento se recobran algunas libertades y la admiración del cuerpo hace incrementar las disecciones en forma sin precedentes.
- Se construyeron teatros de disección.
- El cirujano veneciano Benedetti, realizó excelentes ilustraciones.

Se le atribuye a Giovanni Batista Morgagni, ser el padre de esta especialidad. El publicó la obra única en su género "De Sedibus et Causis Morborum per Anatomen Indagatis", (1682-1761) en Padua. estableció técnicas estandarizadas para la correlación clínico-patológica, dio el inicio a la práctica de esta especialidad en los centros hospitalarios y la necesidad que médicos se dedicaran por completo al desarrollo de esta disciplina. Posteriormente Karl Rokitansky (1804) hizo grandes aportes al desarrollo de la patología y la medicina realizando varias decenas de miles de autopsias, cuyas conclusiones quedaron plasmadas en una serie de publicaciones, muchas de las cuales incluían descripciones inéditas.

A Rudolph Virchow se conoce como el *Padre de la patología moderna*, publicó más de 2000 artículos científicos, se desempeñó como médico, patólogo, antropólogo, paleontólogo y etnólogo. Virchow es el creador de la teoría de la patología celular y muchos de sus conceptos rigen hasta hoy día, siendo él, el que destacara el análisis sistemático de biopsias con estudio microscópico.

- En 1853 Velpeau un cirujano francés introdujo el concepto de la importancia de la microscopía para determinar la conducta biológica de la patología de la mama.
- En 1870 Ruge insiste en la necesidad de conocer la enfermedad antes de cirugías mutilantes.
- La patología la impulsaron cirujanos y ginecólogos en el pasado

Origen de la Patología en Chile

- El Dr. José Joaquín Aguirre, decano de la Facultad de medicina envió a Alemania a Francisco Puelma Tupper alumno de 5° año de medicina quién en 1883 fundó la cátedra en el Hospital San Juan de Dios. Trabajó hasta 1891.

- Le sucedió Aureliano Oyarzún Navarro, trabajando en condiciones muy insuficientes.

- Sucede el Dr. Emilio Croizet quien posteriormente trabajó en el Hospital San Vicente de Paul, luego del incendio que destruyó las dependencias, diseñó el Instituto De Anatomía Valenzuela Puelma Tupper del Hospital José Joaquín Aguirre, La edificación mas grande para estos fines hasta el día de hoy, basado en modelos franceses.

- En 1907 se trató de impulsar la especialidad y se contrató en Alemania al Dr. Max Westenhoeffer , quien se hizo cargo de los hospitales de la Beneficencia. A partir de él en 1930 se crea el semillero de profesores que dan pie a esta especialidad con personalidades como Ismael Mena, Sergio Donoso, Miguel Ossandón
- Hasta 1970 el interés por la patología médica fue predominante.
- La patología quirúrgica se ve impulsada por la Prof. Dra. Virginia Martínez , Directora de este departamento hasta el año 2002, Discípula del Dr. Miguel Ossandón.
- Actualmente hay al menos un patólogo en cada región del país. Unos 150 especialistas, siendo aún una especialidad en falencia.

FUNCIONES DE UN SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA

- Biopsias intraoperatorias o contemporaneas
- Biopsias diferidas (10 a 12 mil anuales)
- Citologías ginecológicas y miscelaneas
- Autopsias no medicolegales (10% egresos fallecidos)
- Reuniones anátomo-clínicas
- Comités oncológicos
- Interconsultas y auditorías
- Investigación
- Docencia

Metodo de estudio en patología

Macroscopía. Citología. Histología básica.

Histoquímica y técnicas especiales. Inmunohistoquímica.

Inmunofluorescencia. Microscopía electrónica.

Citofotometría. Citometría de flujo.

Patología molecular.

Telepatología.

Macroscopía

La técnica básica del examen anátomo patológico es la macroscopía . Permite orientar el diagnóstico, la toma de muestras para el proceso y elegir las técnicas para el diagnóstico

Citología

George Papanicolaou, desarrolló la técnica de citología, que en sus inicios correspondió sólo a citología exfoliativa, es decir aquella que se obtiene mediante la aplicación de una espátula, tórula u otro utensilio sobre una superficie tisular, obteniendo células que habitualmente son de tipo descamativas, poniéndolas en un porta objeto y tiñéndolas con la tinción que lleva el nombre de Papanicolaou; observándose así las características citológicas especialmente nucleares y citoplasmáticas que diferencian unas células de otras y especialmente las de tipo neoplásicas Hoy en día se aplica a la citología por punción a través de aguja fina (PAF) la cual es más corrientemente aplicada en la glándula mamaria.

Otro tipo de citología ampliamente usado es de líquidos o fluidos corporales o lavado de cavidades, que permite mediante la técnica de centrifugado.

TIPOS DE CITOLOGÍA

Exfoliativa

Aspirativa o por punción

Fluidos líquidos o lavados de cavidades.

Raspado impronta o aposición de tejidos.

Fijadores : *Spray, alcohol de 96° , Mezcla de alcohol - citrato*
Muy importante la fijación inmediata

Receta de fijador:

Para preparar 100 cc.

99 ml de metanol al 40 %

1 ml de ácido acético concentrado.

BIOPSIA INTRAOPERATORIA

Se procesa fijando el tejido por congelación

La fijación es el medio por el cual se detiene la autólisis del tejido.

Los cortes se realizan con un micrótomo de congelación con CO2 o un crióstato

Las láminas se tiñen con HE , azul de toluidina u otra técnica

El proceso demora alrededor de 15 minutos dependiendo del número de cortes realizados y la complejidad del caso

Indicaciones

1. Si desea saber el carácter biológico de la lesión para decidir el tipo de cirugía.
2. Si requiere estudio de extensión para decidir tipo de cirugía.
3. Si necesita confirmación de bordes quirúrgicos.

RECURSO CARO Y ESCASO

Etapas de una muestra biopsica diferida

Son numerosas las etapas en el proceso que debe ser acucioso y muy metódico para evitar errores. La mayor parte de ellas son de tipo manual y participan muchas personas.

OBTENCION DE LA MUESTRA

- Biótomo, Punción Muestras endoscópicas (laringe, digestivas, core ...)
- Incisional Muestras diagnósticas (ca de mama , piel, leucoplaquias)
- Excisional Tratamientos con intención curativa o paliativa en general definitiva.

ENVASE

Los requisitos mínimos que debe cumplir un envase son los siguientes:

1. Irrompible
2. Transparente o semi transparente
3. Boca ancha
4. Tapa rosca o hermética
5. De volumen adecuado a la muestra

El envase ideal para depositar una muestra es un frasco de plástico, transparente, con tapa rosca y boca ancha, para que la muestra ingrese y salga con facilidad del frasco, impida la evaporación de la formalina,

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

Al hablar de identificación de la muestra, necesariamente debemos considerar la identificación en el envase o recipiente que contiene el tejido, y la solicitud de examen que debe acompañar a este envase.

Existen además numerosas etapas de control de calidad que se repiten para evitar errores.

SOLICITUD DE EXAMEN:

La solicitud del examen es tal vez el mayor aporte que puede entregar el Clínico al Patólogo para que éste realice un buen diagnóstico.

La solicitud de examen debe contener a lo menos la siguiente información:

1. Nombre completo con ambos apellidos.
2. Edad del paciente o fecha de nacimiento.
3. Sexo.
4. Nombre del profesional solicitante.
5. Organó o lugar de procedencia del tejido.
6. Tiempo de evolución de la enfermedad.
7. Opinión diagnóstica
8. Fecha del examen
9. Toda información clínica relevante.

FIJACION

Uno de los procesos más importantes en la manipulación de las muestras de biopsias corresponde a la fijación. La fijación es el proceso mediante el cual se detiene el proceso de autodigestión citoplasmática y nuclear, permitiendo que la célula mantenga la forma que tenía cuando estaba vital.

No es conveniente congelar las muestras antes de fijarlas, ya que este proceso produce grandes alteraciones celulares.

TIPOS DE FIJADORES:

Los fijadores líquidos más comúnmente usados, ya sea solos o en combinación son la formalina, el alcohol, la acetona, el glutaraldehído y el ácido acético.

El alcohol absoluto es un buen preservante del glucógeno; sin embargo, causa distorsión del detalle nuclear y comprime el citoplasma.

LA FORMALINA:

La formalina es el fijador universal, tiene como componente activo el formaldehído, que es un líquido incoloro o gas con un fuerte olor. Lo más importante en el uso de la formalina es que su aplicación sea en la cantidad adecuada, en proporción a la muestra a fijar. Siempre es conveniente que el líquido fijador esté en 5 a 10 volúmenes por 1 volumen de muestra.

La solución comercial de formaldehído es al 37-40 % que es la llamada formalina pura, al diluir esta solución 10 veces se alcanzará entonces la dilución de formaldehído al 4% ó formalina al 10%.

Formalina al 10%	Preparación 1 litro
Formaldehído al 37-40%	100 cc.
Agua	900 cc.

La solución más óptima es la de formalina tamponada o Buffer, cuya fórmula se describe a continuación:

Formalina al 10% tamponada	1 litro
Formaldehído al 37-40%	100 cc.
Agua destilada	900 cc.
Fosfato de sodio monobásico	4,0 g.
Fosfato de sodio dibásico	6,5 g.

También se puede utilizar la llamada formalina neutralizada, agregando carbonato de calcio o magnesio a saturación, a la solución de formalina al 10%.

RECEPCION EN LABORATORIO

Una vez recibida la muestra en el Laboratorio de Patología, se numera y asigna al patólogo que se hará responsable del resto del proceso en lo posible proceder a su inmediato examen macroscópico y entregar a procesamiento para preparación de láminas histológicas.

MACROSCOPIA

Se describe la muestra en superficie y al corte

Se mide y pesa el tejido

Se selecciona tejido para estudio tomando cortes de 3mm de espesor

Estudios complementarios: cultivos, ME, radiografías, congelación ...

ENCAPSULACION

En este proceso, los trocitos seleccionados en el examen macroscópico, la muestra completa o todos los fragmentos cuando se trata de una biopsia tipo endoscópica, deberán ser separados en cápsulas independientes

INCLUSION

La inclusión es el proceso en el cual se confeccionan los bloques o tacos de parafina sólida en los que queda inserta la muestra que ha pasado por el proceso de deshidratación e impregnación en parafina. Este proceso de deshidratación generalmente ocurre en procesadores automáticos, que trabajan habitualmente durante la noche y cuyo proceso dura generalmente sobre 12 horas

CORTE

Los tacos se colocan en un soporte, el micrótopo de rotación le da un movimiento vertical y al mismo tiempo ejerce un avance de pocos micrones, generalmente 4 ó 5, obteniéndose pequeñas secciones de tejido, que se ponen en un portaobjeto y son adheridas a él mediante secado térmico y por medio de una solución adherente con la cual ha sido previamente tratado el portaobjeto.

TINCION CORRIENTE

La tinción habitual y de rutina en los Laboratorios de Patología, es la denominada Hematoxilina-Eosina. La Hematoxilina es un colorante natural que fue usado por primera vez, alrededor de 1863. En combinación con sales de aluminio, hierro, cromo, cobre o tungsteno, es una tinción nuclear excelente. El otro colorante empleado es la Eosina, que permite dar contraste, tiñendo de rosado el citoplasma de las células y de rojo brillante el colágeno y el tejido muscular.

MICROSCOPIA

En esta fase del procesamiento de una biopsia entra a jugar un rol importante el Anatómo Patólogo, la visión de las placas histológicas bajo el microscopio lo coloca en el momento cúlmine del trabajo en nuestra especialidad. Es en este momento donde se ponen en juego todas las habilidades de memorización, de interpretación, la experiencia vivida en casos anteriores, y todo el procesamiento de la información clínica, tiempo de evolución, edad del paciente, aspecto macroscópico de la muestra, etc., que deberán asociarse a la imagen que se está observando al microscopio, para llegar a una conclusión diagnóstica final.

INFORME ANATOMO PATOLOGICO

El informe anatómo patológico debe contener la descripción macroscópica completa, y una descripción histológica relacionada al fundamento de la conclusión diagnóstica final. La descripción macroscópica y microscópica. El diagnóstico y todos los hallazgos relevantes en la etapificación y el manejo de una patología en particular.

ARCHIVO

Hay 5 componentes que son guardados, producto del procesamiento de una biopsia:

1. **La muestra remanente.**
2. **El taco de inclusión.**
3. **La placa histológica.**
4. **La Solicitud de Examen.**
5. **Copia del Informe Histopatológico.**

Los Laboratorios de Patología a mantienen archivados los tejidos procedentes de un paciente por no menos de 5 años, y preferiblemente no menos de 10 años

HISTOQUIMICA Y T. ESPECIALES

Técnicas de tinción con acción bioquímica sobre el tejido.

La técnica más utilizada es el **PAS** que permite la identificación de mucopolisacáridos, presente en las membranas basales, pared de hongos y mucinas de adenocarcinomas.

El **Pas diastasa** digiere previamente el glicógeno

El Van gieson es una tinción tricrómica que destaca el colágeno.

Plata	- Hongos, membranas basales
Rojo Congo	- Amiloide
Gram	- Bacterias
Ziehl Neelsen	- Bacilos ácido alcohol resistentes
Pearls	- Fierro
Fontana Mason y Grimelius	- Gránulos neurosecreción
Reticulina	- retículo
Von Kossa	- Calcio
Giemsa	- hematología, gérmenes
Oil red O	- Grasa
Luxol fast blue	- Mielina

INMUNOFLUORESCENCIA

Utiliza anticuerpos monoclonales contra diferentes antígenos tisulares o depósitos de inmunoglobulina en membranas basales. Estos anticuerpos son acoplados a sustancias fluorescentes y luego visualizadas mediante un microscopio que emite Luz Ultravioleta, reconociéndose las "fluorescencias" en los sitios donde se ha marcado con el anticuerpo específico, identificándose así el antígeno o sustancia que se busca.

INMUNOHISTOQUÍMICA.

Aplica la tecnología inmunológica que ha permitido producir anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos o sustancias tisulares determinadas. Existen cientos de anticuerpos disponibles que reconocen marcadores tumorales, sustancias tejido específica, diferentes componentes celulares epiteliales, estromales etc.

Indicaciones:

* Tipificación de estirpe celular

*Dg. Diferencial de neoplasias de células grandes o pequeñas.

*Tipificación de neoplasias hematológicas

*Factores pronósticos

- Util, rápida, cara pues se usan paneles de sondas para diagnostico . Se requiere tejido muy bien conservado

A grandes rasgos:

Queratinas: carcinomas, Vimentina : Tumores mesenquimáticos, Ag. Leucocitario común: linfocitos, Actina: músculo liso, HMB45: melanomas

Cromogranina: gránulos de neurosecreción

Otros: ag prostático, RE, Rpr, S100, neurofilamentos

MICROSCOPIA ELECTRONICA

La microscopía electrónica es una técnica de gran costo y sofisticación, Actualmente restringida al estudio renal y de algunos tumores

Fijación: se realiza en glutaraldehído, los cortes son semifinos, se montan en grillas metálicas, se somete a un haz de rayos catódicos

Los aumentos utilizados son:

- M corriente: 4x 10x 40x 1000x Melectronica: 10000x 40000x

Se pueden observar:

- Gránulos de neurosecreción
- Gránulos de Birbeck
- Cuerpos de Weibel Palade
- Melanosomas

CITOFOTOMETRÍA.

Es la combinación de la microscopía óptica y la tecnología computacional. La imagen corte histológico en el microscopio es captada por una cámara de video que entrega información a un computador, que mediante un programa determinado analiza los diferentes componentes que existen en imagen, pudiendo con esta técnica contar núcleos, medir tamaños de diferentes estructuras, analizar densidad de tinción, lo que nos permite indirectamente cuantificar diferentes componentes

CITOMETRÍA DE FLUJO

Es una técnica totalmente diferente que utiliza una tecnología sofisticada mediante rayos láser. En este caso las células como su nombre lo dice, están en suspensión. Un flujo de hileras de una sola célula que han sido previamente marcadas con sustancias fluorescentes y son estimuladas con un rayo láser y diferentes detectores que captan reflexión o intensidad de la fluorescencia, permitiendo así medir o cuantificar las células que han sido marcadas. Esta tecnología tiene dos grandes aplicaciones:

- Se analizan 5000 a 10000 células por seg. Pasando por haces de luz en dos direcciones
- Un computador hace un histograma integrando la información

Se puede medir varios parámetros de las células en suspensión bajo un haz de luz (tamaño, densidad, granularidad, fenotipo al incubarse con sondas fluorescentes...)

- Gran utilidad en tipificación de linfomas y leucemias

PATOLOGÍA MOLECULAR

Las técnicas desarrolladas que se pueden aplicar a cortes histológicos, células microdisecadas o macerados de cortes de tejido fijado e incluido en parafina son.

Hibridación in situ: complementación de pares de bases entre dos hebras sencillas mediante sondas(DNA RNA) reveladas con cromógeno

FISH es una técnica de hibridación con sonda fluorescente

Citogenética

PCR: (1984) Método de amplificación de DNA usando una DNA polimerasa altas concentraciones de desoxirribonucleótidos

(denaturalización , alineación, síntesis de hebra complementaria) Se usan sondas para gérmenes TBC HPV , translocaciones genéticas ...

TELEPATOLOGÍA

Es posible transmitir a través de microscopios con cámaras de video y computadores la información digitalizada.

Se pueden realizar clases, interconsultas y apoyo al diagnóstico.