

Microscopia electrónica

Carlos BARBA

Centro de Microscopía Electrónica («Luis Bru»)
de la Universidad Complutense. Madrid

En este capítulo vamos a recoger, de forma sintética, cuatro trabajos en los que el Centro de Microscopía Electrónica «Luis Bru» de la UCM ha colaborado o colabora con el Servicio de Urología del Hospital Universitario de San Carlos.

Los dos primeros han sido realizados totalmente en su fase experimental y lo que se expone en un resumen escueto de publicaciones o comunicaciones basadas en los resultados. El tercero es un trabajo que actualmente está en fase experimental con resultados coherentes y muy prometedores. Finalmente el cuarto trabajo es un proyecto ya elaborado y que estimamos es de gran interés.

En lo que se presenta a continuación se ha procurado destacar el papel de la microscopía electrónica y sus técnicas asociadas contempladas como herramientas para coadyuvar en la solución de algunos problemas que presenta la Urología Clínica.

CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DEL *DETRUSOR-NORMAL E INSUFICIENTE*

Características ultraestructurales del detrusor normal

Al microscopio electrónico, la célula muscular lisa del detrusor presenta un núcleo suavemente perfilado y redondeado en sus extremos. El sarcoplasma contiene finas mitocondrias y algunos elementos del retículo endoplasmático granular, así como numerosos ribosomas libres. La mayor parte del citoplasma se ocupa por miofilamentos paralelos, extremadamente finos,

agrupados en haces de grosor variable que corresponden a las miofibrillas visibles al microscopio óptico. En su mayor parte están orientadas paralelamente al eje longitudinal de la célula. Entrelazadas entre los haces de miofibrillas se encuentran las mitocondrias que aparecen aisladas o en pequeños grupos de orientación preferentemente longitudinal (Figura. 1). Esparcidas entre la sustancia contráctil se encuentran zonas densas fusiformes u ovaladas. A gran aumento estas zonas aparecen atravesadas por miofilamentos incluidos en una matriz amorfa electrodensa.



Fig. 1.—Célula muscular lisa vesicular humana normal: (a) caveolas, (b) miofilamentos, (c) áreas densas que corresponden a placas de anclaje de los miofilamentos.

El plasmalema situado entre los lugares de fijación de los miofilamentos, se encuentran punteado por pequeños embolsamientos vesiculares llamados «caveolas», interpretados comúnmente como evidencia de micropinocitosis (Figura 2).

La superficie de cada célula de músculo liso está revestida por una gruesa envoltura extracelular. Las células adyacentes, por ello, están separadas por una distancia de 400 a 800 Å. No se encuentran desmosomas típicos. Sin embargo, las zonas densas especializadas en que terminan los miofilamentos



Fig. 2.—Músculo detrusor normal: (a) caveolas en proximidad del contacto, evidencia de micropinocitosis, (b) detalle de contacto intercelular.

aparecen frecuentemente enfrentadas. Puede encontrarse una línea densa intermedia en la sustancia intercelular entre dos de estas zonas densas enfrentadas.

La célula contraída se hace elíptica mostrando invaginaciones de superficie en los puntos de fijación de miofilamentos. La fuerza se transmite probablemente a las células adyacentes, a través de la vaina de tejido conjuntivo reticular. En algunas zonas de la superficie celular del músculo liso vesical no se observa sustancia intercelular, encontrándose las membranas adyacentes en estrecha asociación, reduciéndose el espacio intercelular a menos de 20 Å. Estas zonas de unión reciben el nombre *nexos* (Figura 2). Se cree que son puntos de baja resistencia eléctrica, que permiten el libre movimiento de iones y la transmisión de la excitación de una célula a otra.

Características ultraestructurales del detrusor insuficiente

Hay descritas alteraciones no patológicas en el detrusor hipocontráctil (Elvadawi *et al.*, 1990) asociadas al envejecimiento del detrusor, como con la

aparición de bandas largas en el sarcolema de la célula muscular lisa, ramificaciones de células musculares con fibroelastosis en la hipertrofia del detrusor, protusiones de las uniones intercelulares también en esta misma entidad y degeneración profunda de la célula muscular lisa y de los axones, secundaria o no a obstrucción del tracto utinario inferior.

En pacientes con insuficiencia contráctil, la ultraestructura del músculo detrusor e intersticio, muestra diversos grados de degeneración celular, así como una mayor degradación del intersticio (Figura 3).



Fig. 3.—*Detrusor humano insuficiente. Presenta un discreto aumento de (a) colágeno en el espacio intersticial, y de (b) lisosomas en las células musculares lisas.*

A nivel celular, el plasmalema de la célula muscular lisa del detrusor insuficiente no presenta alteraciones groseras significativas respecto de las de detrusor normal, aunque no se aprecian con igual frecuencia la aparición de *caveolas*. Las uniones intercelulares tipo *nexo* se observan con menor frecuencia, si bien su apariencia ultraestructural es normal. Una observación que llama la atención es la presencia de depósitos lipídicos intracelulares, de

lisosomas degenerados, cuerpos «cebra» y acúmulos de lipofucsina, que están asociados a degeneración celular.

En lo que se refiere al sistema de microtúbulos y mecanismo contráctil, se ha demostrado la aparición de signos de desestructuración de los miofilamentos, lo que confiere un aspecto menos homogéneo a la célula y una disminución de las zonas densas o placas de anclaje. El acúmulo de glucógeno, perinuclear o no, es una característica normal de la célula muscular lisa. En el detrusor insuficiente aparece con variaciones respecto del patrón normal tendiendo a la dispersión en la célula.

No se han podido demostrar signos de cromatolisis axonal, si bien hay que tener en cuenta lo difícil que resulta en el detrusor insuficiente localizar azones o terminaciones nerviosas.

Características morfoestructurales del detrusor en respuesta a la obstrucción del tracto urinario inferior

Se ha demostrado (Dixon *et al.*, 1983) marcados cambios histológicos a nivel del detrusor en respuesta a la obstrucción del tracto urinario inferior, estos cambios incluyen infiltración del detrusor por bandas de colágeno e hipertrofia de la célula muscular lisa. Estudios posteriores en animales de estos mismos autores demostraron en presencia de obstrucción al flujo urinario afectación nerviosa del control de la actividad vesical (Gosling *et al.*, 1968), sin embargo, la alteración de la inervación en la obstrucción no ha sido estudiada. Estos autores demostraron una reducción de fibras nerviosas colinérgicas en el detrusor con obstrucción al flujo de salida (comprobada mediante morfometría cuantitativa con microscopía óptica y electrónica).

La conducción célula a célula es lo que contribuye a generar la fuerza contráctil vía eléctrica en el entramado muscular. Morfológicamente esta vía de baja resistencia ha sido asociada a contactos intercelulares cuando tiene lugar la fusión de membranas a nivel de uniones especializadas, tipo nexos (Barr *et al.*, 1968). Un puente intercelular de este tipo ha sido descrito en el músculo liso vesical, con aposición de células sin fusión de membranas, siendo denominado «puntos de contacto intermedio». Después de una distensión vesical prolongada, estos puntos de contacto intermedios permanecen inalterados (Shen, 1979) (Figura 4), en cuanto a estructura y distribución, comparándolos a grupos control de ratas y conejos. Después de distensión prolongada, los axones demuestran una reacción degenerativa transitoria caracterizada por hinchazón y cromatolisis del contenido nervioso. En este período se observa la aparición de numerosos cuerpos densos que bien caracterizados, son lisosomas que contribuyen al proceso de cromatolisis. Los axones hinchados de fibras amielínicas fueron descritos por Tuckett en 1895 y reenfanzado por Cajal en 1928, siendo esto apreciado con el advenimiento de la microscopía electrónica de transmisión.



Fig. 4.—Ultraestructura del detrusor con obstrucción del tracto urinario inferior:
(a) unión intercelular sin alteraciones.

CORRELACIÓN EXISTENTE ENTRE *SEDIMENTO URINARIO* DE ENFERMOS LITIÁSICOS Y *FRAGMENTOS DE CÁLCULOS* OBTENIDOS POR *LITOFRAGMENTACIÓN*

El material empleado para el estudio fue:

- La orina de los pacientes prelitotricia.
- Fragmentos expulsados de cálculos tras la aplicación a estos enfermos del proceso ESWL.

Las muestras se procesan del modo que se expone a continuación:

- a) Estudio de la orina por análisis rutinario DRAS (microscopía óptica a 40 x).
- b) El sedimento se trató además filtrándolo con «micropore» de 0,2 micras, y deshidratándolo con una batería de alcoholes de concentración creciente hasta alcohol absoluto.

Este filtro sobre el que se habían retenido los elementos suspendidos en la orina se le hizo un punto crítico y una posterior metalización para poder estudiar los sedimentos por microscopía electrónica de barrido.

c) Los fragmentos de cálculos expulsados tras aplicar la litofragmentación una vez secos y metalizados fueron estudiados por microscopía electrónica de barrido.

Los resultados obtenidos son muy reveladores. Se ha realizado el estudio de 47 muestras y las conclusiones se sintetizan en los puntos que se exponen a continuación:

1. Los enfermos litiasicos tienen una concentración patológica de proteínas en su orina (>30 mg/dl). Sólo un porcentaje muy pequeño presenta valores más bajos (aprox. 10 %).

2. Las proteínas en orina no son valorables por microscopía óptica. Sólo el estudio por microscopía electrónica de barrido puede informar de su capacidad agregante y promotora de gérmenes de nucleación.

3. Son raros los hallazgos de cilindros proteicos y relativamente frecuentes los de filamentos proteicos.

4. No sólo las proteínas tales como mucoproteínas y uromucoides atrapan cristales, también debe existir un cambio de potencial en las membranas de células excretadas en la orina, sobre todo leucocitos y glóbulos rojos, que emiten desmosomas sobre los cristales, atrapándolos y aglutinándolos, produciendo núcleos promotores para la formación de cálculos o nucleaciones secundarias de alta velocidad de crecimiento.

5. Cuanto mayor es la concentración proteica en el sedimento y cuanto mayor capacidad tienen estas proteínas de aglutinarse con los cristales, la compactación del cálculo es menor y por lo tanto la aplicación de *litofragmentación* más favorable al ser menos traumática y con más probabilidades de éxito.

6. El componente proteico del cálculo no solamente actúa como germen de nucleación originario, sino que los filamentos, células, leucocitos y glóbulos rojos formarían un esqueleto que potencia el crecimiento del cálculo.

7. En enfermos litiasicos, con infecciones de orina, se ha visto la influencia que tiene esta infección por el hallazgo de piocitos atrapando cristales y el incremento de la velocidad de crecimientos de los cálculos.

8. El hallazgo de filamentos proteicos sobre fragmentos confirma que éstos originan zonas frágiles que facilitan enormemente la fractura del cálculo aunque éste sea de oxalato cálcico monohidrato.

9. Las líneas de fractura facilitadas por el cambio de composición de una época a otra de crecimiento estarían influidos por hábitos alimenticios, cantidad de líquidos ingeridos y variaciones del pH, ya que estos factores son los principalmente implicados en la variación de composición.

10. Deben existir algunos factores que promueven algún cambio eléctrico en proteínas y membranas pasando a ser auténticos *promotores* que inician la enfermedad litiasica.

Los promotores están relacionados con los componentes orgánicos existentes en la orina y pueden por tanto promover la formación de cálculos (Hallson & Rose, 1979, Rose & Sulaiman, 1984).

Estas proteínas promotoras pueden aparecer secundariamente a una irritación de la mucosa (Kitamura *et al.*, 1982) provocada, por ejemplo, por la existencia de un cálculo primario o una infección urinaria.

Las Figuras 5, 6 y 7 corroboran algunos de los datos recogidos en los 10 puntos precedentes.

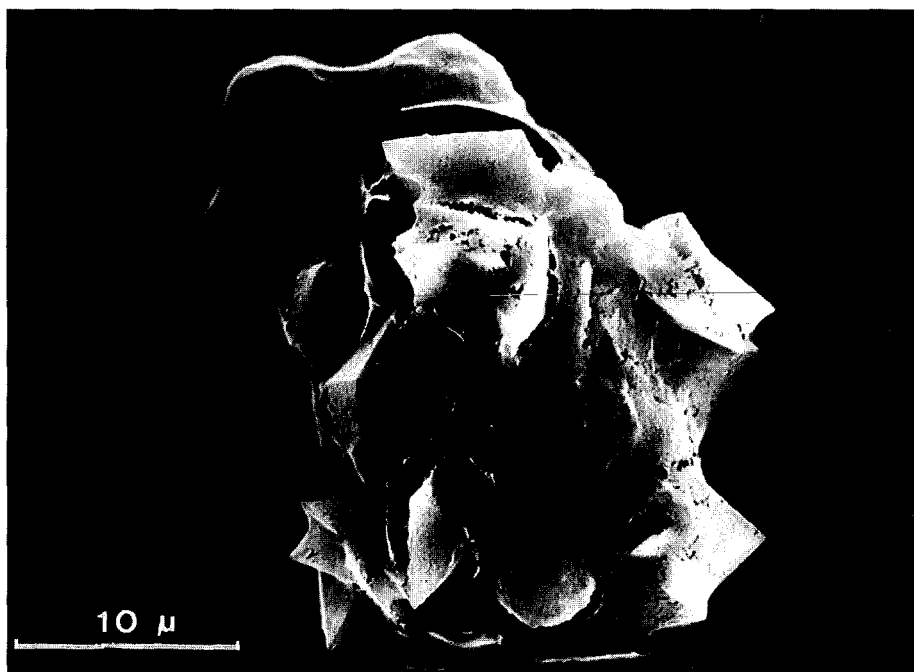


Fig. 5.—Microscopía electrónica de barrido. Ejemplo de la capacidad agregante y promotora de gérmenes de nucleación de las proteínas excretadas en la orina (punto 2).

ULTRAESTRUCTURA CELULAR Y COMPORTAMIENTO FISIOPATOLÓGICO EN LA *GLANDULA PROSTATICA* HUMANA

Este trabajo tiene su antecedente en el desarrollo por Wang *et al.*, 1991, y col. en los que se demuestra la necesidad de inervación para mantener la integridad estructural y funcional de la próstata en ratas macho Sprague-Dawley.

En la *próstata* de animales con *denervación completa* del complejo prostático la microscopía óptica, muestra una disminución de la altura de las célu-

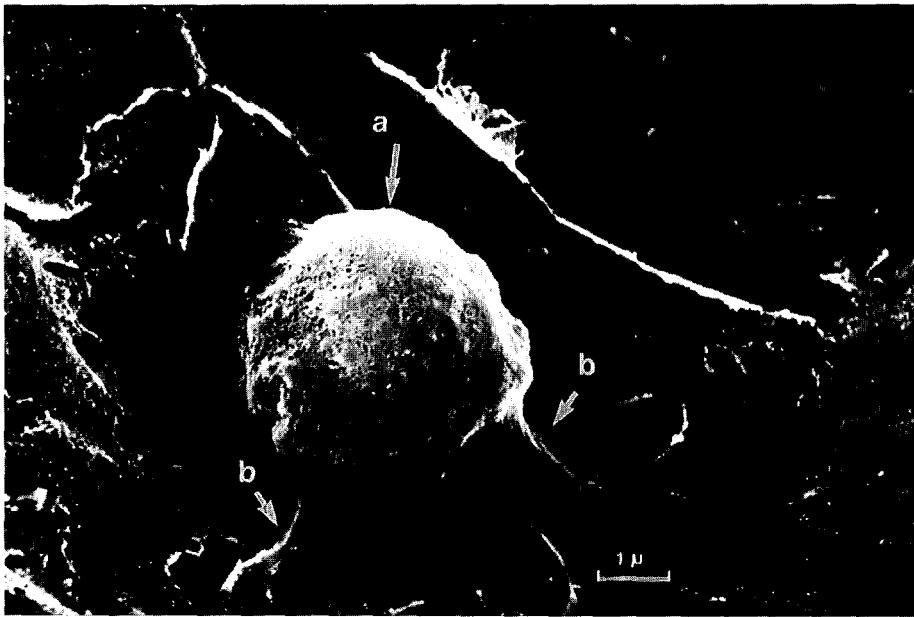


Fig. 6.—(a) Leucocito emitiendo (b) desmosomas (punto 4).



Fig. 7.—Filamentos proteicos sobre la superficie de fractura (a).
Fragmento de cálculo, obtenido post-litotricia.

las, un incremento de las vacuolas y la aparición de espacios vacíos en las próstatas de animales denervados.

El estudio ultraestructural hecho sobre las mismas muestras con microscopía electrónica de trasmisión, las células epiteliales prostáticas normales presentan un núcleo basal rodeado por un retículo endoplásmico, una zona supranuclear con abundantes mitocondrias, aparato de Golgi bien desarrollado y frecuentes vesículas y una zona apical extensa caracterizada por su retículo endoplásmico, vesículas secretoras y abundantes microvillis en la región luminal. En las próstatas denervadas la zona apical aparece deprimida y disminuyen las vesículas secretoras y las microvillis. La región supranuclear también está reducida.

Estudiando la relación longitud/anchura de las células epiteliales prostáticas, estadísticamente, se observa una reducción del 25 % en las células de las próstatas denervadas.

Basándonos en estos estudios y en otros trabajos que recoge la biliografía, Baugarten *et al.*, 1968; Vaalasti *et al.*, 1980, y Martínez-Piñeiro *et al.*, 1993, se está realizando un trabajo de tesis doctoral (A. Páez) en tejido epite-

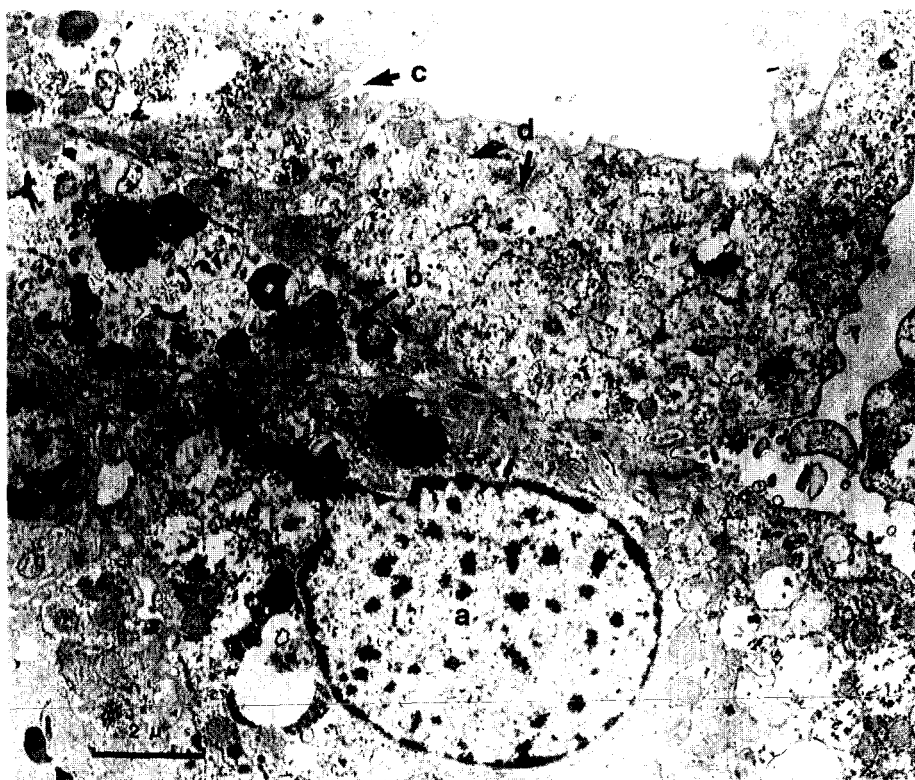


Fig. 8.—Célula epitelial prostática humana normal: (a) núcleo, (b) mitocondrias, (c) microvillis, (d) vesículas secretoras.

lial prostático humano procedente de biopsias en el que se recoge un estudio morfométrico y una correlación con hallazgos clínicos.

La Figura 8 correspondiente a dicha tesis, muestra la estructura típica de una célula epitelial prostática humana normal, análoga a la que muestra la próstata de las ratas macho en los estudios antes mencionados. En ella se observa el núcleo basal, la zona supranuclear con abundantes mitocondrias y la zona apical con algunos microvillis.

La Figura 9 muestra un detalle de la zona apical de la célula recogida en la Figura 8.

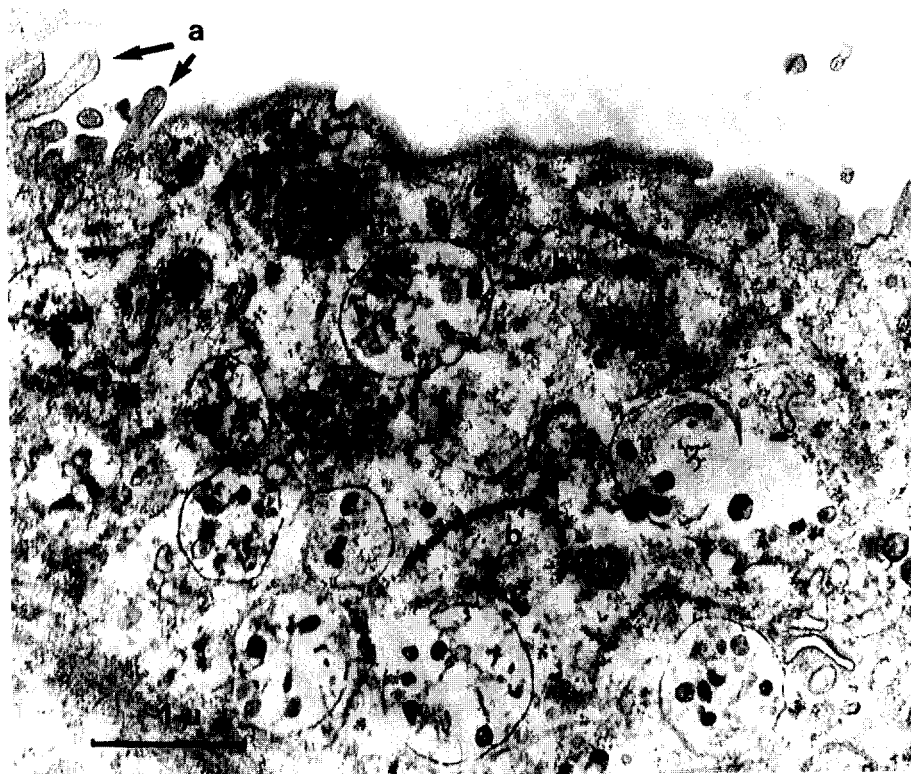


Fig. 9.—Detalle de figura 8: (a) microvillis, (b) vesículas secretoras.

DETECCIÓN DE *ONCOGENESIS* CON TÉCNICAS DE INMUNOMARCADO EN *UROONCOLOGÍA* (Proyecto)

Un cierto número de genes denominados *proto-oncogenes* (*c-onc*) modifican diferentes aspectos de la actividad celular que incluyen la producción de factores de crecimiento, transductores de señal y factores de transcripción nuclear.

Los proto-oncogenes (c-onc) se pueden activar por diversos mecanismos pasando a oncogenes (c*-onc). Estos oncogenes pueden perturbar los mecanismos del crecimiento celular y de la diferenciación normal conduciendo al primer estadio de un proceso neoplásico. Los múltiples estadios de los procesos neoplásicos pueden necesitar la intervención de varios oncogenes. Sin embargo, no todos los factores que son críticos para la proliferación y la diferenciación celular están asociados a oncogenes conocidos.

Los proto-oncogenes pueden ser activados por mutaciones puntuales (cambio en una sola base) amplificación (el gen está copiado varias veces), traslocación (el gen está situado en una secuencia diferente a la normal) e inserción en un virus (inserción en un elemento genético móvil).

Actualmente, las técnicas de detección bioquímicas de estos oncogenes son: RFLP (Restriction Fragments Length Polimorfism) (Barbacid, 1987), prueba de oligonucleótidos (Bos, 1988), desajuste en el emparejamiento del RNA (López-Galíndez, 1988) y PCR (Polimerasa Chain Reaction) (Saiki, 1988).

El inmunomarcado de oncogenes o del m-RNA inducido por ellos y su observación con microscopía electrónica de transmisión puede ser una prueba alternativa, siendo éste el objetivo del presente proyecto. El inmunomarcado con oro coloidal se basa en un descubrimiento relativamente antiguo. Por Forsgren *et al.* en 1966, fue aislado un polipéptido de superficie en el *S. aureus*, denominado proteína A, que presentaba una afinidad específica por la región Fc de diversas especies de inmunoglobulinas G (Ig G). La proteína A, marcada con oro coloidal, ha demostrado ser una herramienta sensible y muy específica para detectar anticuerpos o complejos antígeno-anticuerpo, con la de resolución espacial de la microscopía electrónica de transmisión (Roth *et al.*, 1978). Actualmente para algunas inmunoglobulinas G (IgG) que no reconoce la proteína A se emplea la proteína G, aislada del grupo G de streptococos humanos o la proteína AG obtenida por ingeniería genética y que presenta un espectro más amplio (Ghitescu *et al.*, 1991).

En muchos casos los efectos de la activación del oncogen se puede detectar midiendo los niveles de m-RNA inducidos, los cuales se pueden detectar por técnicas de radio inmunomarcado o por marcado con oro coloidal.

En la primera opción las muestras de tejido tumoral serán criofijadas y cortadas con un criomicrotomo, postfijadas con formaldehído al 4 % y seguidamente hibridadas «in situ» con un RNA complementario marcado con ³⁵S y procesadas para autorradiografía.

En la segunda opción la hibridación se hace también «in situ» en este caso con una sonda biotinilada y se conjuga, de manera directa o con una etapa intermedia, con un sistema marcado con partículas de oro coloidal.

Estas técnicas presentan la ventaja de ser específicas y muy sensibles. Asimismo muestran la situación del m-RNA dentro de la estructura celular con una precisión análoga a la que presenta la técnica de radio inmunomarcado.

En uro-oncología clínica, dadas sus características y accesibilidad, en muchos casos, para la toma de muestras estas pruebas pueden jugar, en el futuro, un papel de gran interés.

BIBLIOGRAFIA

- Barbacid, M.: «Ras genes». *Ann. Rev. Biochem.*, 1987; 56:779-827.
- Barr, L.; Berger, W. and Dewey, M. M.: «Electrical transmission at the nexus between smooth muscle cells». *J. Gen. Physiol.*, 1968; 51:347.
- Baugarten, H. G.; Falkc, B.; Holstein, A. F.; Owman, C. H. and Owman, T.: «Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate. A fluorescence microscopic and fluorimetric study». *Z. Zellforsch.*, 1968, 90:81.
- Bos, J. T.: «The ras gene family and human carcinogenesis». *Mutat. res.*, 1988; 195:255-271.
- Cajal, S. R.: *Degeneration and regeneracion of the central nervous system*. Oxford University press. London, 1928.
- Dixon, J. S.; Gilpin, S. A.; Gilpin, C. J. and Gosling, J. A.: «Intramural ganglia of the human urinary bladder». *Br. J. Urol.*, 1983; 55:195-198.
- Elvadawi, A.; Mller, L. F.; Yalla, S. V.; Resnick, N. M.: «Correlative structural/urodynamic grouping patterns of detrusor abnormality in geriatric voiding disfunction». *Neurourol. Urodyn.*, 1990; 9:407-408.
- Gosling, J. A.; Gilpin, S. A.; Dixon, J. S. and Gilpin, C. J.: «Decrease in the autonomic innervation of human detrusor muscle in autfba obstruction». *J. Urol.*, 1986; 136:501-504.
- Forsgren, A.; Sjöqvist, J.: «Protein A from *S. aureus*: pseudoimmune reactions with human gammaglobulin». *J. immunol.*, 1966; 97:822.
- Ghitescu, L.; Galis, Z. and Bendayan, M.: *Protein AG-gold complex: An alternative probe in immunocytochemistry*, 1991; 39:1057.
- Hallson, P. C.; Rose, G. A.: «Uromucoids and urinary stone formation». *Lancet i*, 1979; 1000.
- Kitamura, T.; Zerwekh, J. E.; Pak, C. Y. C.: «Partial biochemical and physicochemical characterization of organic macromolecules in urine from patients with renal stones and control subjects». *Kidney Inter.*, 1982; 379-386.
- Kondo, A. and Susset, J. G.: «Viscoelastic properties of bladder. II. Comparative studies in normal and pathological dogs». *Invest. Urol.*, 1974; 11:459.
- López-Galíndez, C.; López, J. A.; Melero, J. A. *et al.*: «Analysis genetic variability and mapping of point mutations in influenza virus by RNase. A mismatch cleavage method». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988; 85:3522-3526.
- Martínez-Piñeiro, L.; Rajvir Dahiya; Lora, L.; Tanagho, E. and Schmidt, R.: «Pelvic Plexus denervation in rats causes morphologic and funtional changes of the prostate», 1993; 150:215-218.
- Rose, G. A.; Sulaiman, S.: «Tamm-Horsfall mucoprotein promotores calcium phosphate crystal formation in whole urine: quantitative studies». *Urological Research*, 1984; 12:217.
- Roth, J.; Bendayan, M.: «Ultrastructural localization of intracellular antigens by use of protein A-gold complex». *J. Histochem. Cytochem.*, 1978; 26:1074.
- Saiki, R. K.; Gelfrand, D. H.; Stoffel, S. *et al.*: «Primer -directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase». *Science*, 1988; 239:487-491.
- Shen, J. T.: «The ultrastructural effects of distension on the neuromuscular apparatus of the urinary bladder». *Invest. Urol.*, 1979; 16, 5:369-375.
- Tuckett, I. L.: «The structure and degeneration of non-medullated nerve fibres». *J. Physiol.*, 1895; 19:267.

- Vaalasti, A. and Hervonen, A.: «Autonomic innervation of the human prostate». *Invest. Urol.*, 1980; 17:293.
- Wang, J.; McKenna, K. E.; McVary, K. T. and Lee, C.: «Requirement of innervation for maintenance of integral and functional integrity in the rat prostate». *Biol. Reprod.*, 1992; 44:1171.