

Ultraestructura de un Tumor de Células Granulares

Estudio con el Microscopio Electrónico

DR. JUAN JOSÉ SEGURA FONSECA*

INTRODUCCION:

Desde la descripción clásica del mioblastoma de células granulares hecha por Abrikossoff en 1926, quien propuso el término de "mioma mioblástico" y de hecho el origen miogénico de esta lesión (1-2); su naturaleza y su histogénesis han sido el objeto de estudio de numerosos investigadores y la mayoría consideran esta lesión como una neoplasia. Varias hipótesis han sido propuestas desde el punto de vista histopatogénico, desde una malformación congénita hasta una forma de enfermedad por depósito (3), pasando por una etiología inflamatoria no específica y parasitaria (12), implicando diferentes tipos celulares tales como el músculo estriado (19), el histiocito (13), y los fibroblastos (21), como la célula de origen de este proceso patológico. Fust y Custer (9-10), creían que el tumor representaba una forma de neurofibroma. Pearce (21) estudió los gránulos desde el punto de vista histoquímico y concluyó que la lesión representa una degeneración granular del citoplasma de los fibroblastos peri o endoneurales. En base de estudios histoquímicos, Bangle (4, 5) hace énfasis en que los gránulos tienen una composición similar a la de la mielina alterada, tal como se observa en lesiones experimentales de nervios periféricos mielinizados, y enfatiza el origen neural de la lesión, lo mismo que Ratzenhofer quien propone un origen neurovegetativo a partir de las fibras o red terminal de Remak (22). Investigaciones más recientes con la ayuda del microscopio electrónico, han producido varias hipótesis sobre el origen y los estudios reportados son más consistentes con un origen neural, habiéndose postulado que las células granulares derivan de células de Schwann, que han sido alteradas por un proceso todavía no conocido, aunque no existe completa unanimidad (8, 17, 18, 24).

El propósito del presente estudio es reportar la ultraestructura de uno de estos tumores y enfatizar los hallazgos; proponiéndose que complejos mecanismos de autodigestión celular en el que toman parte organelas citoplásmicas muy especializadas, desencadenados por factores no conocidos, juegan papel muy importante en la génesis de esta neoplasia.

* Department of Pathology, Washington University, School of Medicine and Snodgrass Laboratories of Pathology and Bacteriology St. Louis, Missouri; y Departamento de Patología, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

MATERIAL Y METODOS:

La lesión se encontraba en la zona dorsal del brazo derecho de un hombre de raza negra, de 45 años de edad. El espécimen quirúrgico consiste de una porción de piel que mide 5 cms. de longitud por 3 cm. de ancho, en cuyo centro se encuentra una lesión de aspecto verrucoso, elevada de color café oscuro y de bordes más o menos bien delimitados. Las secciones transversales del tumor ponen de manifiesto un tejido blanquecino, de aspecto fibroso que penetra profundo en la dermis, y el aspecto hiperqueratósico y verrucoso de la epidermis (Fig. 1-2).

Para la microscopía de luz se efectuaron tinciones con hematoxilina y eosina, hematoxilina ácido fosfotúngstico (P. T. A. H.), técnica de Schiff (P. A. S.), Cristal Violeta y Rojo Congo para amiloide. Se efectuaron también secciones de tejido congelado que se tiñeron con aceite Rojo - 0 (Oil-Red-0) para demostrar lípidos y la impregnación argéntica de Sevier-Munger para neurofibras.

Para el proceso de microscopía electrónica se tomaron porciones pequeñas de tejido, de aproximadamente 3x3x3 mm. de tamaño, de diversas áreas de la epidermis y dermis profunda, éstas se suspendieron y se lavaron durante 12 horas en una solución tampón de fosfato de sodio a un pH de 7,4 (Solución tampón de Milloning), luego se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2,5% en solución de fosfato de sodio con un pH de 7,2 durante 2 horas y se post fijaron en una solución fría al 1% de tetraóxido de osmio ($Os O_4$) en solución de fosfato de sodio durante una hora. La deshidratación se efectuó en soluciones de concentración ascendente de alcohol etílico y las inclusiones se hicieron usando resinas plásticas de tipo Epóxido (D.E.R. 732) siguiendo la técnica de Lookwood (16).

Las secciones ultrafinas se cortaron en un ultramicrotomo Porter-Blum, tipo MT-2, usando cuchillas de vidrio y diamante y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, siguiendo el método propuesto por Reynolds (23). El examen ultramicroscópico se hizo en dos microscopios electrónicos, un Philips, EM-100 y el otro R.C.A. modelo EM-3 a 50 Kv.

RESULTADOS:

Examen con el microscopio de luz: el patrón histológico del tumor muestra áreas de hiperqueratosis muy acentuada, con papilomatosis e hiperplasia pseudoepiteliomatosa con formación de perlas epiteliales de aspecto benigno; estas áreas son las que han sido confundidas con carcinomas epidermoides bien diferenciados cuando la lesión se ha encontrado en la laringe o en el árbol bronquial y las biopsias han sido superficiales (Fig. 3). La dermis presenta una infiltración por cordones de células redondas u ovales con núcleos centrales y una característica granularidad y eosinofilia del citoplasma con gránulos finos; estos cordones celulares ocupan los espacios de las papilas dérmicas pero no invaden la epidermis. No se observan figuras mitóticas, y los núcleos no presentan criterios de malignidad. (Fig. 4). Los gránulos se tiñen intensamente con la técnica de P.A.S. y con el aceite - rojo-0, demostrando material lípido. Las tinciones para amiloide no son específicas y con la técnica de P.T.H. los gránulos adquieren un color azul pálido. Las impregnaciones argénticas son negativas.

Examen con el microscopio electrónico: las células presentan núcleos de diverso tamaño, algunos con bordes muy irregulares e invaginaciones profundas de la membrana nuclear. El nucleoplasma es finamente granular y ocasionalmente

la cromatina se halla condensada en la periferia. Los nucléolos son prominentes y muestran claramente sus componentes. Las membranas citoplasmáticas son bien delimitadas y en algunas áreas las células se observan en grupos separados por espacios intercelulares con abundantes fibras colágenas y en cuyas membranas se encuentran abundantes vesículas pinocitóticas. (Fig. 5, 6, 7). Algunas células son fusiformes, con haces paralelos de fibras colágenas y los núcleos son alargados semejando fibroblastos. El citoplasma en general es muy complejo, en el que se encuentran numerosas vacuolas limitadas por membranas y gránulos de intensa osmiofilia y alta densidad electrónica. Las vacuolas contienen en su interior gránulos y material amorfo densamente osmiofílico. Los gránulos son de diverso tamaño y se encuentran libres o agrupados y rodeados por una sola membrana. En el interior de muchas vacuolas se identifican fragmentos de mitocondrias, figuras de mielina y agrupaciones de gránulos osmiofílicos cuyo tamaño varía entre 650 m μ y 1000 m μ . Es interesante observar que en algunas áreas los gránulos de alta densidad electrónica rodeados de una membrana están formados por la agrupación de múltiples gránulos esferoidales de tamaño más pequeño. (Fig. 10). Algunas células presentan áreas de rarefacción citoplásmica y haces de abundantes filamentos finos cuyo grosor varía 100 A y 150 A. (Fig. 7), y material denso a los electrones consistente con una membrana basal. (Fig. 6, 7). Las áreas de menor densidad citoplasmática han sido interpretadas como el axoplasma de axones no mielinizados y a la presencia de una membrana basal y filamentos en el citoplasma como evidencia ultramicroscópica que caracteriza a las células de Schwann. En algunas células se observan mitocondrias y agregados de polirribosomas libres no asociados con el retículo endoplásmico. El complejo de Golgi no está bien delimitado y su identificación es difícil. No se observan nervios asociados a las células neoplásicas, ni evidencia ultraestructural de un origen miogénico.

DISCUSION:

Los estudios previos con el microscopio electrónico del mioblastoma de células granulares ofrecen datos que sugieren un origen neural, concepto que fue iniciado por Feyrter (7), basado en la observación morfológica de que células granulares indistinguibles de las que forman la lesión se encuentran dentro de las vainas perineurales de nervios periféricos. Posteriormente este hallazgo fue estudiado por Thoren (26), quien realiza un análisis químico en dos casos, encontrando una concentración elevada de fosfolípidos como para postular la génesis neural de las células. Bangle, (4, 5) realiza importantes observaciones y en su estudio hace énfasis en la presencia de gránulos similares a los del tumor en las células fagocíticas que se observan en lesiones de nervios periféricos mielinizados cuando estos son sometidos a diversos procesos degenerativos. Fisher y Wechsler (8) corroboran estos hallazgos en el microscopio electrónico, mediante un estudio paralelo entre un tumor y nervios periféricos sometidos a diverso trauma, observándose que las células tumorales presentan aspectos estructurales similares a las células de Schwann de los nervios dañados por la experimentación y haciendo uso de técnicas histoquímicas encuentran una elevada concentración de fosfatasa ácida en los gránulos de ambas células, postulando que las células de Schwann adquieren propiedades histiocíticas durante el proceso de degeneración Walleriana, lográndose identificar por la presencia de áreas de menor densidad electrónica en el citoplasma, correspondientes a axoplasma de axones no mielinizados, la deposición de material de membrana basal denso a los electrones junto a la membrana celular, y a la actividad de fosfatasa ácida que ha sido reconocida como una propiedad inherente a los histiocitos (29).

Los resultados de nuestro trabajo con el microscopio electrónico apoyan en cierta forma la hipótesis neural basado en la identificación en las células tumorales de estructuras citoplásmicas que identifican a las células de Schwann, tales como la presencia de haces de filamentos en el citoplasma (Fig. 7, 8), material de membrana basal y áreas de axoplasma (Fig. 6), y que han sido transformadas por la presencia de gran cantidad de gránulos y vacuolas que en estudios previos han sido identificados como partículas de probable origen viral (18), a los que recientemente se les ha dado más importancia ya que es el cambio más llamativo en el citoplasma de estas células. Los análisis histoquímicos demuestran que los gránulos presentan gran actividad de fosfatasa ácida, hallazgo que nos lleva a postular que las células granulares son verdaderos histiocitos o células de otra estirpe, ya sean células del neurilema o fibroblastos que han adquirido capacidades fagocíticas por un estímulo no dilucidado hasta el momento, pero que puede tener explicación en base a hallazgos en nuestro caso, no mencionados en previos estudios ultraestructurales, cuales son la presencia de una marcada actividad endocitótica que se manifiesta por la presencia de múltiples vesículas micropinocitóticas tales como las que se observan en las figuras 10, 11, 12, y que estaría de acuerdo con el concepto propuesto por Garancis y colaboradores (11), de que los cambios observados en las células representan un defecto focal de los lisosomas. De acuerdo a los conceptos de DeDuve (6-20) los lisosomas son estructuras citoplásmicas limitadas por membranas que contienen una gran concentración de enzimas hidrolíticas, principalmente esterasas ácidas, de las cuales la fosfatasa ácida forma la mayor parte y cuya función principal es la de actuar en los procesos de digestión celular. El sitio de origen de estas enzimas son los ribosomas, ganando luego acceso al retículo endoplásmico que los transporta al complejo de Golgi en donde presumiblemente son almacenados como lisosomas primarios. Los lisosomas secundarios son entonces estructuras citoplásmicas en donde las enzimas y el sustrato se hallan juntos, pudiéndose observar diferentes estadios de la digestión celular. Estos se dividen en vacuolas digestivas si el material ingerido es exógeno y vacuolas autofágicas si el material es endógeno como ocurre en el proceso de degradación focal del citoplasma, estudiado por Hruban y colaboradores (27), y finalmente cuerpos residuales en los que se reconocen el material resultante del proceso digestivo como son fragmentos de mitocondrias, residuos de retículo endoplásmico y diversos arreglos de membranas que han sido degradadas, tales como figuras de mielina. Nuestro estudio revela la presencia de una intensa actividad pinocitótica (Figs. 10, 11, 12) y diversas fases en la formación de vacuolas autofágicas en las que se distinguen claramente fragmentos de mitocondria, gránulos, figuras de mielina y material osmiofílico en el interior de vacuolas limitadas por una membrana unitaria (Fig. 11). Rosai (24) recientemente efectuando ultracentrifugación fraccionada logró separar los gránulos del resto de los componentes citoplásmicos, observando que estos contienen concentraciones elevadas de fosfatasa ácida cuando el homogenizado fue observado en el microscopio electrónico aportando así más evidencia hacia el origen lisosómico de los gránulos, y Swift y Hruban (28) logran producir vacuolas autofágicas que contienen fragmentos de mitocondrias, ribosomas, residuos de retículo endoplásmico y arreglos concéntricos de figuras de mielina en el tejido acinar del páncreas de ratas, inhibiendo la síntesis del colesterol mediante la administración de triparanol, sugiriendo que el proceso de degeneración focal del citoplasma con la formación de vacuolas autofágicas, cuerpos residuales y lisosomas secundarios tienen base estrictamente metabólica. Los resultados del presente trabajo enfatizan la teoría metabólica propuesta por Haisken y Langer (13) en la génesis de esta lesión, basados en los hallazgos de una prominente endocitosis y se propone que estímulos no conocidos juegan papel importante en la transformación de células

altamente especializadas como las células de Schwann o fibroblastos en células con cualidades fagocíticas caracterizadas por la presencia de abundantes lisosomas secundarios.

RESUMEN

En este trabajo se describen los resultados del estudio ultraestructural de un tumor de células granulares de la piel del brazo de un hombre de 45 años de edad. Estudios previos con el microscopio electrónico han sugerido un origen neural. Los resultados de este trabajo dan apoyo a la hipótesis neural por identificación en las células tumorales de estructuras citoplásmicas propias de las células de Schwann. Se observó una actividad endocitótica muy acentuada, manifestada por la presencia de múltiples vesículas micropinocitóticas, por lo que se propone que estímulos no conocidos juegan un papel importante en la transformación de células de Schwann o fibroblastos en células con cualidades fagocíticas, caracterizadas por la presencia de abundantes lisosomas secundarios.

SUMMARY

This is a report on the ultrastructure of a granular cell tumor of the skin of the arm in a 45 yr. old male. Previous studies with the electron microscope have suggested a neural origin. The results of this study support the neural hypothesis through the identification in tumor cells of cytoplasmic structures present in Schwann cells. Marked endocytotic activity was observed, made evident by the presence of multiple micropinocytotic vesicles. It is suggested that unknown factors play an important role in the transformation of Schwann cells or fibroblast in cells with phagocytic properties, characterized by the presence of abundant secondary lysosomes.

Figura 1

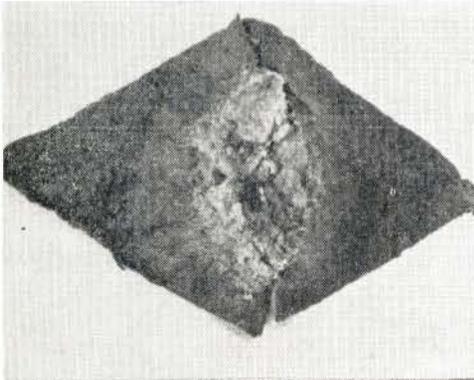


Figura 2

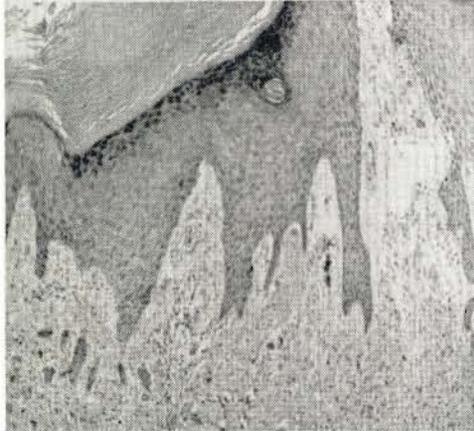
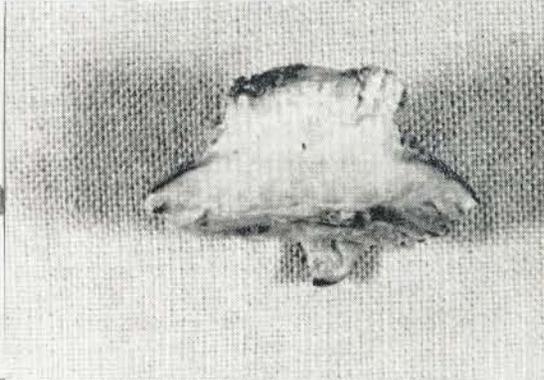


Figura 3



Figura 4

Fig. 1.—Aspecto verrucoso de la lesión, con bordes definidos e hiperqueratósicos.

Fig. 2.—Corte transversal que muestra un patrón verrucoso y cordones fibrosos en la dermis.

Fig. 3.—Marcada hiperqueratosis y papilomatosis. La dermis se encuentra infiltrada por células homogéneas. H. & E. 100 x.

Fig. 4.—Cordones de células granulares de forma oval, con núcleos centrales. Obsérvese la granularidad homogénea del citoplasma y el límite con la epidermis. H. & E. 450 x.

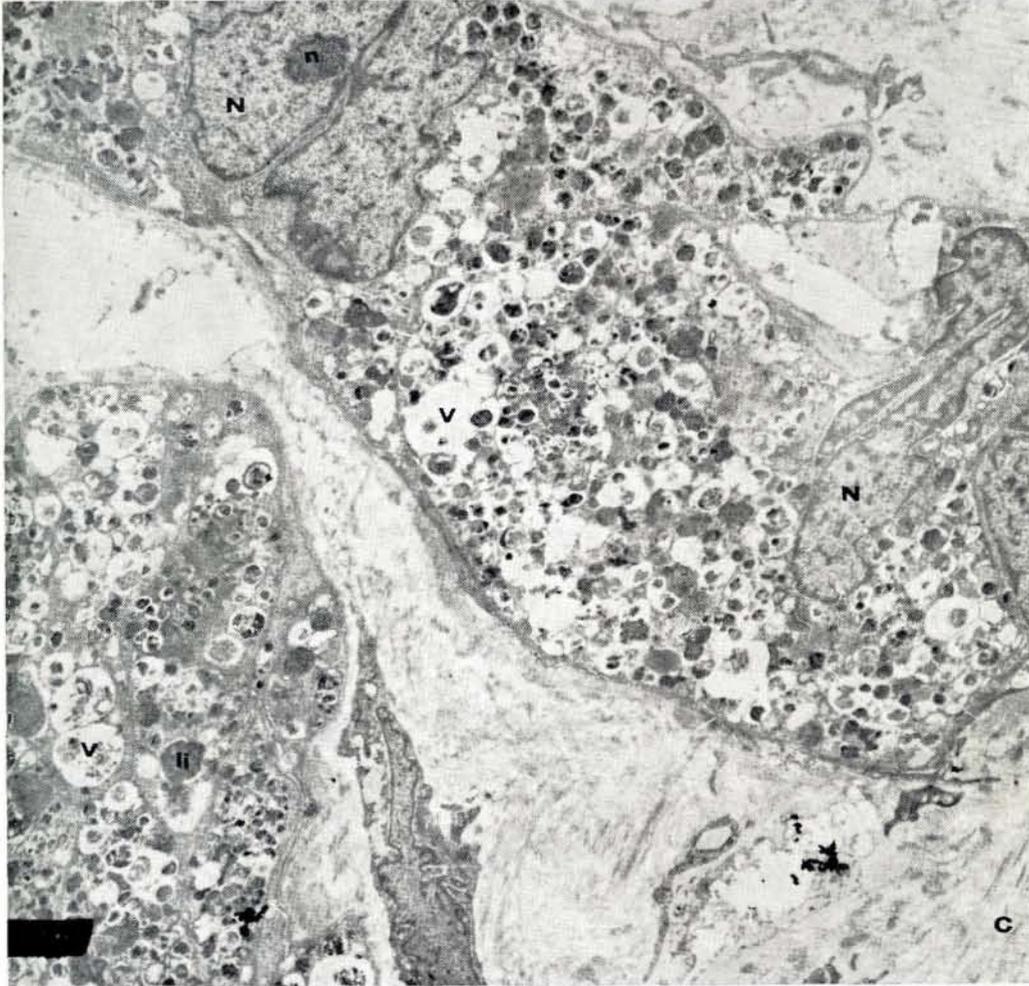


Fig. 5.—Se observan numerosas vacuolas en el citoplasma, algunas contienen gránulos osmiofílicos (V) y cuerpos lisosómicos (Li). Los núcleos (N) son prominentes, con membranas nucleares muy irregulares. (C) Fibras colágenas; n, nucleolo. Acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 6400x.

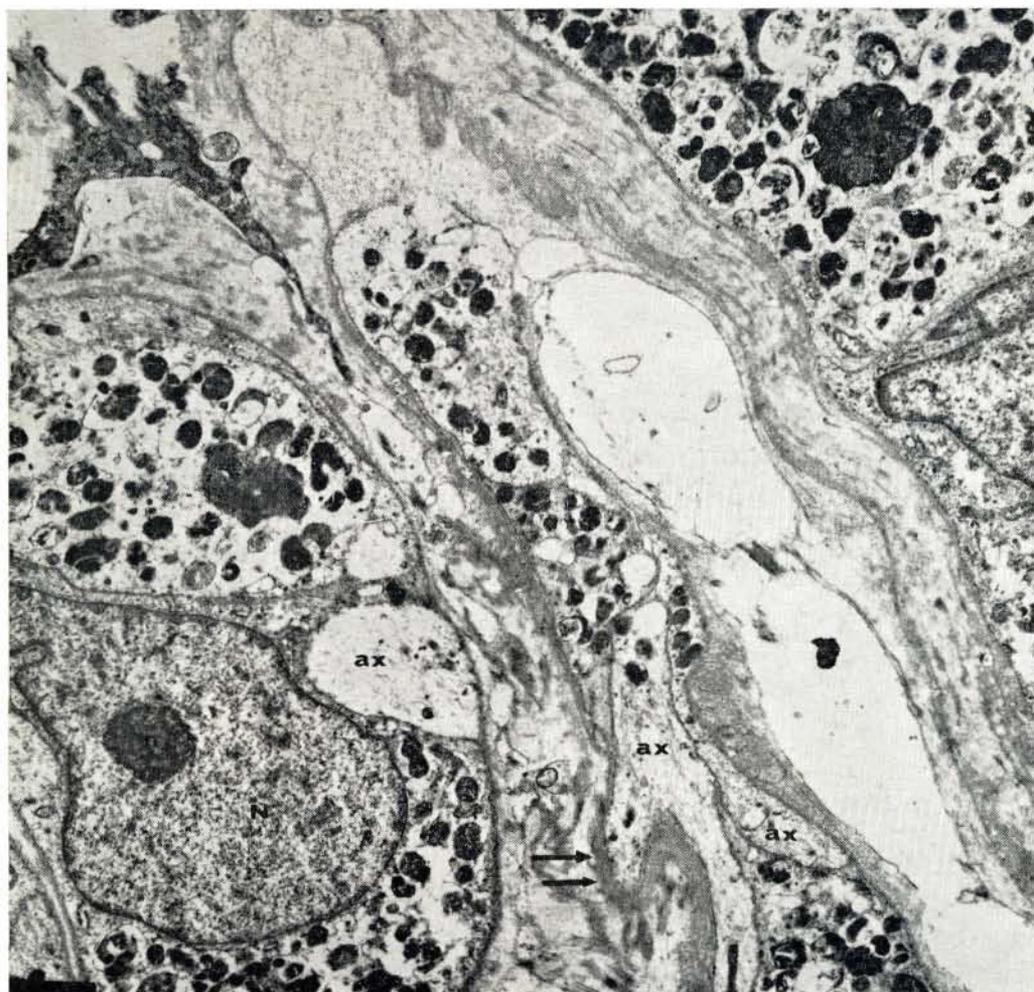


Fig. 6.—El citoplasma contiene numerosos gránulos osmiofílicos y áreas de axoplasma (ax). Las membranas citoplásmicas son prominentes, y se observa material denso de membrana basal (Flechas). N, núcleo; n, nucleolo. Acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 10.000x.

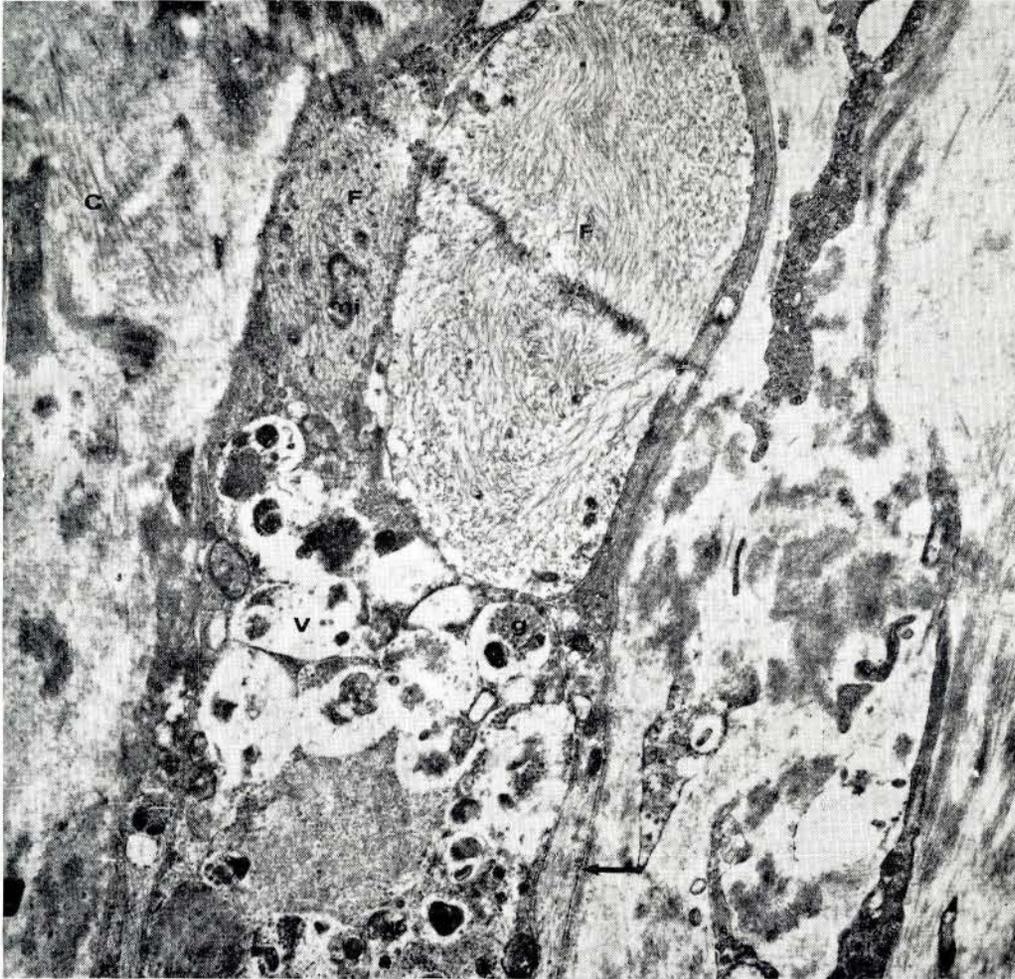


Fig. 7.—Haces de filamentos finos (F) se encuentran en el citoplasma. Las vacuolas (V) contienen gránulos osmiofílicos (g) y figuras de mielina (m). Una mitocondria (mi) presenta signo de degeneración. La flecha señala dos vesículas pinocitóticas. C, fibras colágenas. Acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 6000x.

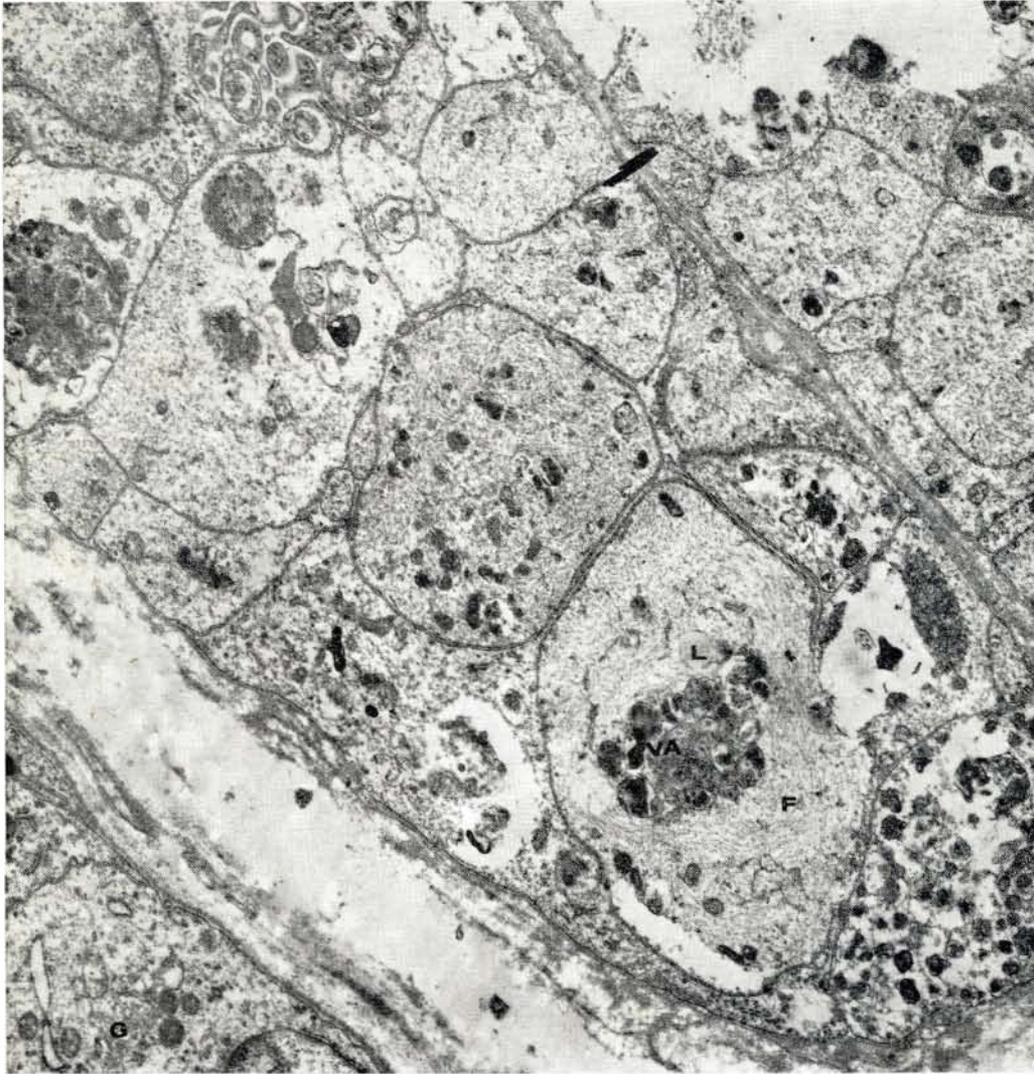


Fig. 8.—Grupos de células separadas por membranas. Finos filamentos (F), vacuolas autofágicas (VA) y cuerpos lípidos (L) se encuentran en el citoplasma. Pequeñas vesículas del complejo de Golgi (G) se reconocen. Acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 6.500x.

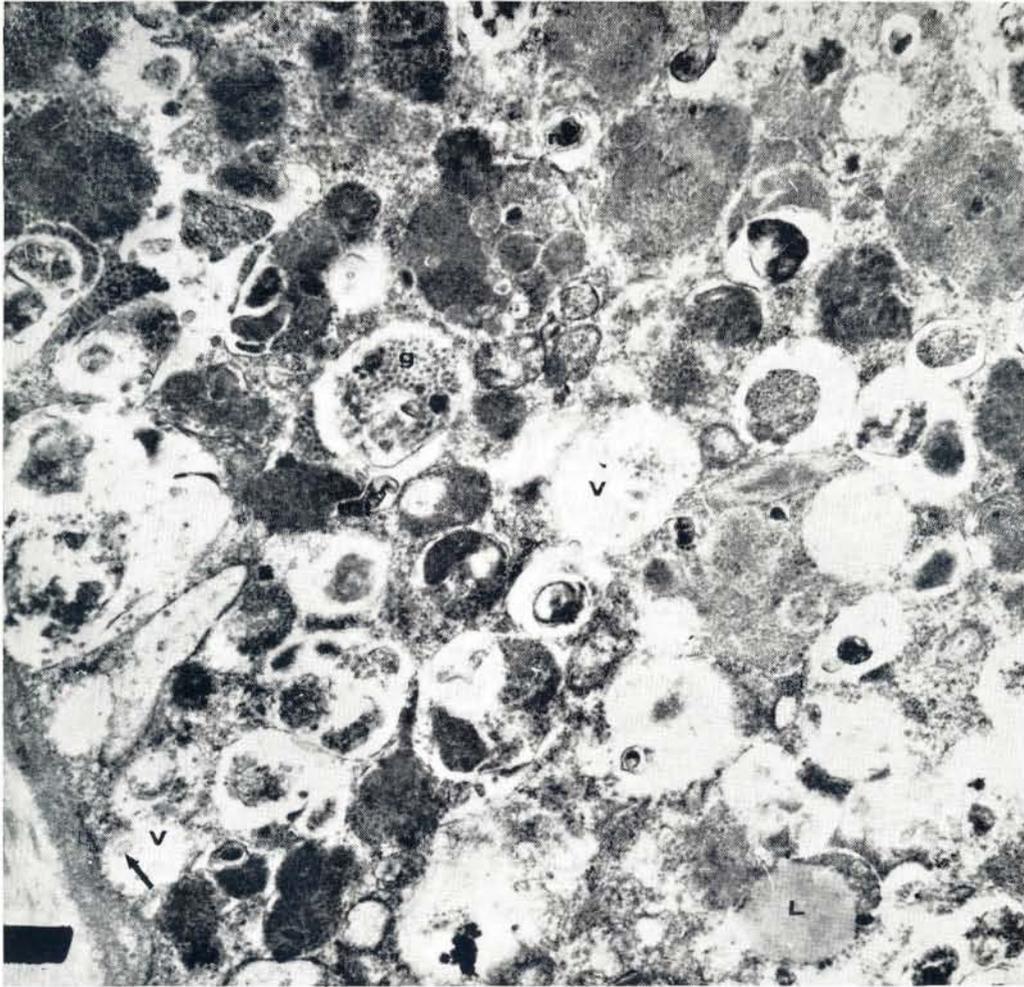


Fig. 9.—Los gránulos osmiofílicos (g) se encuentran dentro de vacuolas autofágicas, lo mismo que algunas vesículas micropinocitóticas (flechas), y fragmentos de mitocondrias (mf.) m, figuras de mielina; L, cuerpo lípido. Acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 30.000x.

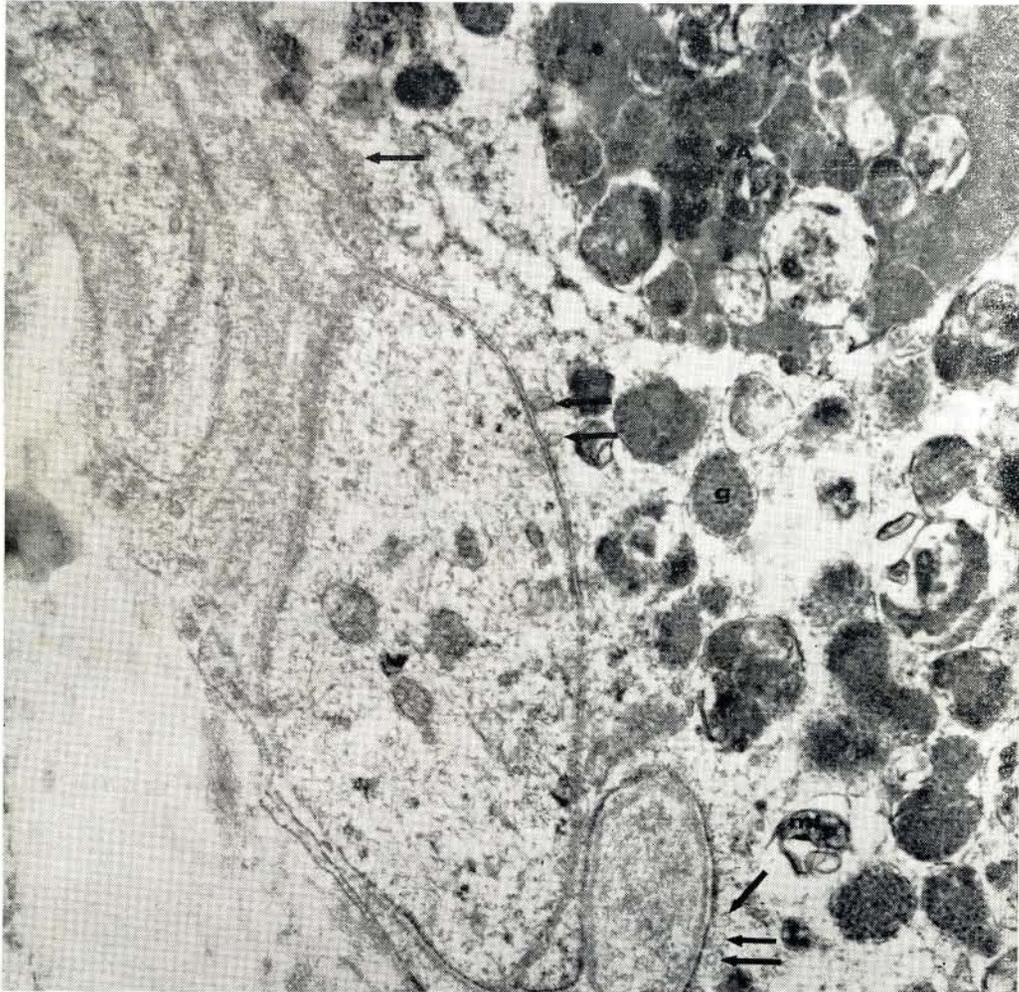


Fig. 10.—Grupos de gránulos osmiofílicos se observan rodeados de una membrana (g). Una vacuola autofágica que contiene cuerpos osmiofílicos, fragmentos de mitocondria y material denso a los electrones (VA). Las flechas señalan múltiples vesículas pinocitóticas a lo largo de la membrana celular. (mf), membranas mitocondricas en fase temprana de arreglos de mielina. Acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 22.000x.

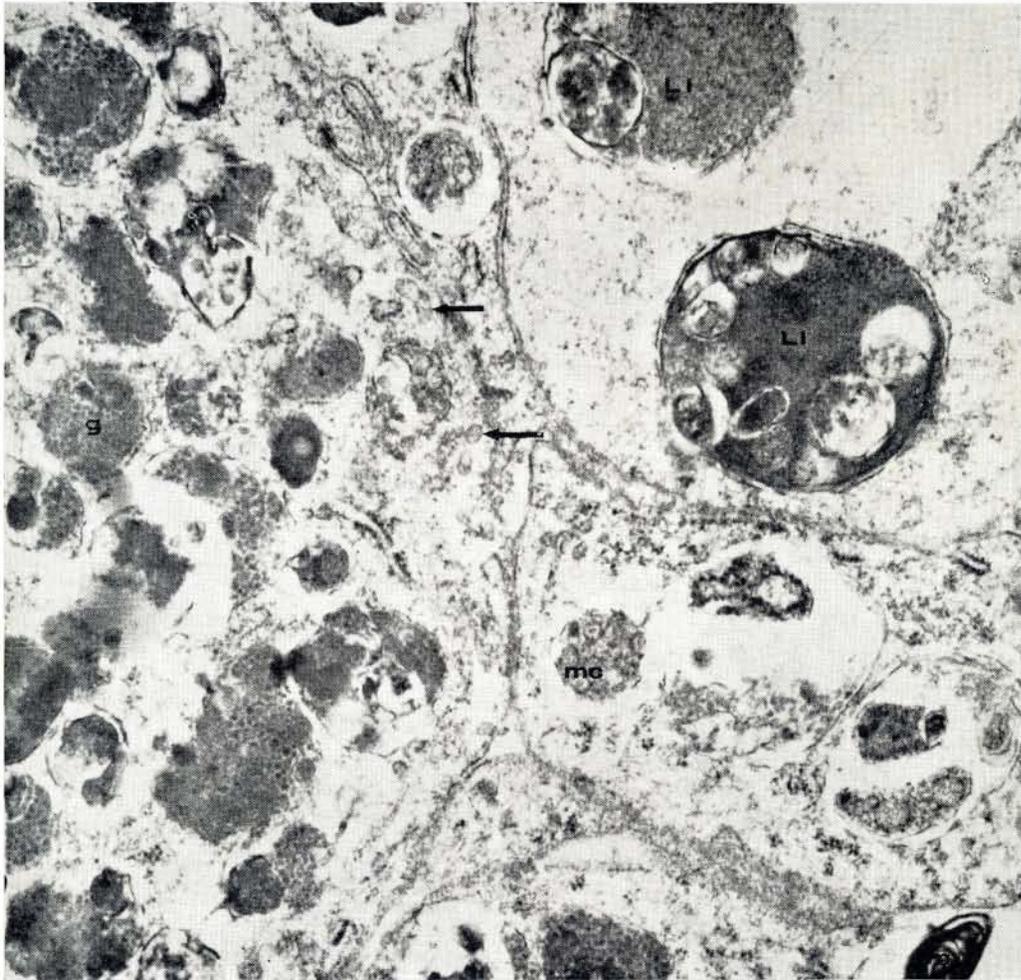


Fig. 11.—Las flechas señalan vesículas pinocitóticas integradas al citoplasma. Algunas agrupadas forman cuerpos multivesiculares (mc). LI, lisosomas limitados por una membrana que contiene en su interior material y gránulos osmiofilicos y fragmentos de mitocondria. m, figura de mielina; g, gránulos. Acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 22.000x.

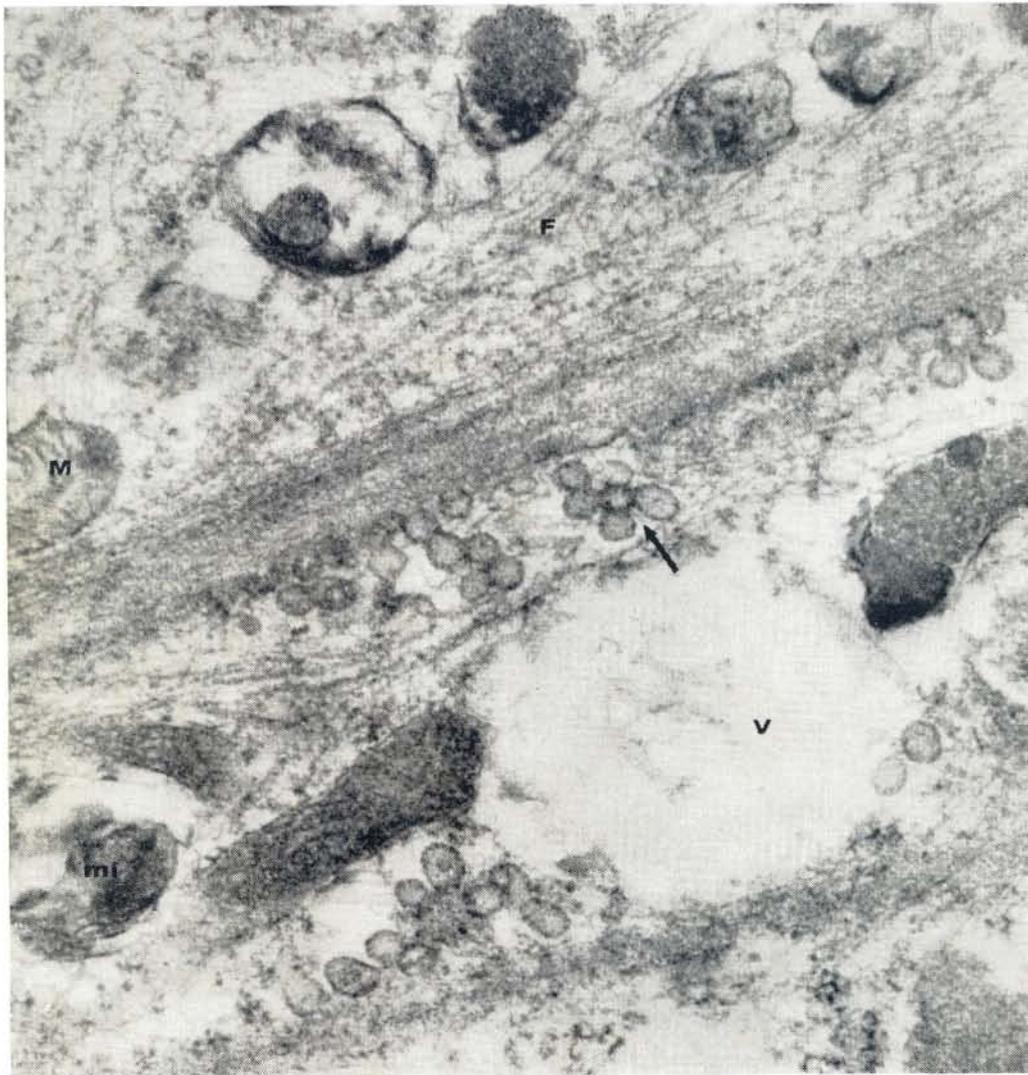


Fig. 12.—Múltiples vesículas pinocitóticas se observan agrupadas (flecha), en algunas es posible observar gotas ultramicroscópicas en su interior y otras se encuentran incorporadas en vacuolas (V). M, mitocondria, mi, mitocondria en proceso degenerativo; F, filamentos. Acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 90.000x.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ABRIKOSOFF, A.
Weitere Untersuchungen über Myoblastenmyome. *Virchows Arch.* 280:723-740, 1931.
- 2.—ABRIKOSOFF, A.
Über Myome, ausgehend von der quergestreiften Willkürlichen Muskulatur. *Virchows Arch.* 206:215-233, 1931.
- 3.—AZZOPARDI, J. G.
Histogenesis of granular cell "myoblastoma". *J. Path. & Bact.* 71:85-94, 1956.
- 4.—BANGLE, R., JR.
A morphological and histochemical study of the granular cell myoblastoma. *Cancer* 5:950-965, 1952.
- 5.—BANGLE, R., JR.
An early granular cell myoblastoma confined within a small peripheral myelinated nerve. *Cancer* 6:790-793, 1953.
- 6.—DE DUVE, C.
From cytases to lysosomes. *Fed. Proc.* 23:1045-1049, 1964.
- 7.—FEYRTER, F.
Über die granulären neurogenen Gewächse. *Beitr. Path. Anat. V. Allg. Path.* 110:181-208, 1949.
- 8.—FISHER, E. R.; WECHSLER, H.
Granular cell myoblastoma. A misnomer. Electron microscopic and histochemical evidence concerning its Schwann cell derivation and nature (granular cell Schwannoma). *Cancer* 15:936-954, 1962.
- 9.—FUST, J. A.; CUSTER, R. P.
The neurogenesis of so-called granular cell myoblastoma. *Am. J. Clin. Path.* 19:522-535, 1949.
- 10.—FUST, J. A.; CUSTER, R. P.
Granular cell "myoblastoma" and glandular cell "neurofibromas"; separation of neurogenous tumors from the myoblastoma group. *Am. J. Path.* 24:674, 1948.
- 11.—GARANCIS, J. C.; KOMOROWSKI, R. A.; KUZMA, J. F.
Granular cell myoblastoma. *Cancer* 25:542-550, 1970.
- 12.—GULLINO, P.
Sui cosiddetti "Tumori di mioblasti" interpretati come granulomi di probabile origine parasitaria. *Tumori* 20:102-128, 1946.
- 13.—HAISKEN, W.; LANGER, E.
Die submikroskopische Struktur des sogenannten Myoblastenmyoms (Lipidfibrom, granuläres Neurom). *Frankfurter Z. Path.* 71:600-612, 1962.
- 14.—HAUSMAN, R.
Granular cells in musculature of the appendix. *Arch. Path.* 75:360-372, 1963.
- 15.—HIRSCH, J. G.; COHN, Z. A.
Digestive and autolytic functions of lysosomes in phagocytic cells. *Fed. Proc.* 23:1023-1025, 1964.
- 16.—LOOCKWOOD, W. R.
A reliable and easily sectioned epoxy embedding medium. *Anat. Rec.* 150:129-140, 1964.

- 17.—MISUGI, K.; MISUGI, N.; NEWTON, W. JR.
Ultrastructure of a so-called granular cell myoblastoma. *Yokohama Med. Bull.* 18: 225-234, 1967.
- 18.—MOSCOVIC, E. A.; AND AZAR, H. A.
Multiple granular cell tumors ("myoblastomas"). Case report with electron microscope observations and review of literature. *Cancer* 20:2032-2047, 1967.
- 19.—MURRAY, M. R.
Culture characteristics of three granular cell myoblastomas. *Cancer* 4:857-865, 1951.
- 20.—NOVIKOFF, A. B.; ESSNER, E.; QUINTANA, N.
Golgi apparatus and lysosomes. *Fed. Proc.* 23:1010-1025, 1964.
- 21.—PEARCE, A. B. E.
The histogenesis of granular cell myoblastoma (granular cell perineural fibroma). *J. Path. & Bact.* 62:351-362, 1950.
- 22.—RATZENHOFER, M.
Granulare Falsche Neurome (Sog. Myoblastenmyome) und sekundäre invasive Wucherung des Deckepithels. *Virchow Arch. Path. Anat.* 320:138-163, 1951.
- 23.—REYNOLDS, E. S.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-212, 1963.
- 24.—ROSAI, JUAN.
Comunicación personal, St. Louis, Mo., 1970.
- 25.—SOBEL, H. J.; CHURG, T.
Granular cells and granular cell lesions. *Arch. Path.* 77:132-141, 1964.
- 26.—THOREN, L.
On nature and pathogenesis of so-called Abrikossof tumor. *Upsala Lak. Forh.* 55:127-145, 1950.
- 27.—HRUBAN, Z.; SPARGO, B.; SWIFT, H.; WISSLER, R. W.; AND KLEINFELD, R. G.
Focal cytoplasmic degradation. *Amer. J. Path.* 42:657-683, 1963.
- 28.—SWIFT, H.; HRUBAN, Z.
Focal degradation as biological process. *Fed. Proc.* 23:1026-1037, 1964.
- 29.—MONIS, B.; AND WEINBERG, T.
Cytochemical study of esterase activity of human neoplasms and stromal macrophages. *Cancer* 14:369-377, 1961.