

Estudio ultraestructural de un tumor de Ewing*

DR. JUAN JOSÉ SEGURA FONSECA**

Desde la descripción original por Ewing en 1921, la histogénesis del tumor que lleva su nombre ha sido un enigma. Este autor creía que la lesión tiene un origen vascular dada la disposición frecuente de células dentro y alrededor de los vasos sanguíneos, por lo que lo llamó "Endotelioma difuso del hueso" (5, 6). Algunos autores creen que la célula de donde deriva el tumor de Ewing es de estirpe mieloide reticular por su parecido con las células de los linfomas histiocíticos (reticulosarcomas), primarios de los ganglios linfáticos (15, 16, 27, 28, 29), sin embargo para Willis todos los tumores clasificados como sarcomas de Ewing son neuroblastomas metastásicos, muchas veces a partir de un neuroblastoma oculto, enfatizando este hecho en las similitudes tanto histopatológicas como roentgenográficas que presentan ambos tumores (1, 3, 22). Los estudios de la ultraestructura y cultivo de las células tumorales, si bien no definen un origen específico, han ayudado a descartar un origen enteramente vascular, aunque esos resultados no son completamente uniformes existiendo divergencias de opinión en los resultados obtenidos por los diferentes autores (9, 10, 11, 24, 27). El propósito del presente trabajo es el de informar sobre la ultraestructura de un tumor de Ewing y discutir los hallazgos.

INFORME DE UN CASO

Se trata de una mujer de raza negra, de 19 años de edad que ingresó en el hospital de la ciudad de San Luis, Missouri, Estados Unidos, con dolor y signos de inflamación en la mitad superior del muslo izquierdo, de varias semanas de evolución, sin antecedentes de traumatismo. La exploración física mostró aumento de volumen con enrojecimiento en la región anterointerna de la mitad superior del muslo. En los exámenes de laboratorio se encontró leucocitosis de 9500 por mm^3 con una cuenta diferencial normal. Una radiografía del muslo mostró un ligero ensanchamiento de la cavidad medular del fémur, con bordes internos irregulares y pequeñas zonas de rarefacción en la corteza ósea (Fig. 1). Una radiografía del tórax así como radiografías del resto del esqueleto no mostraron metastásis. Se le efectuó una biopsia, encontrándose infiltración de las masas musculares por un tejido blanquecino de consistencia friable y una corteza ósea muy delgada y porosa.

* Parte de este trabajo se realizó en los Laboratorios de Microscopía Electrónica del Departamento de Patología del Hospital Barnes y Escuela de Medicina de la Washington University, San Luis, Missouri.

** Departamento de Patología, Hospital San Juan de Dios, y Cátedra de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica.

MATERIAL Y METODO

Para la microscopía de luz las secciones representativas de la biopsia se incluyeron en parafina y se emplearon las siguientes tinciones: hematoxilina y eosina, tinción de Laidlaw para retículo y la técnica del ácido periodico de Shiff (P. A. S.) para la demostración de glicógeno.

Para su observación con el microscopio electrónico se cortaron bloques de 2 mm cúbicos de volumen, se suspendieron y se lavaron durante doce horas en amortiguador de fosfato de sodio a un pH de 7, 4, luego se fijaron en una solución de glutaraldehido al 2,5% durante dos horas y se postfijaron en una solución fría de tetraóxido de osmio al 1% a 4 C° en una solución de fosfato de sodio durante una hora. Las muestras fueron luego deshidratadas en solución de alcohol etílico de concentración ascendente y óxido de propileno, para luego ser incluidas en Epon 812, siguiendo la técnica de Looockwood (16). Las secciones ultrafinas se cortaron empleando un ultramicrotomo Porter-Blum tipo MT-2 y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, según el método propuesto por Reynolds (14), para observarse en un microscopio electrónico R.C.A. modelo EMU-3.

RESULTADOS

Microscopio de luz:

Se observa un tumor constituido por células grandes, ligeramente redondas, muy regulares, con escaso citoplasma, núcleos grandes, con la cromatina dispersa y nucleólos algo prominentes. Las membranas nucleares se observan bien delimitadas y los bordes celulares son poco definidos. Las células se disponen en grupos y muestran ocasionalmente un arreglo perivascular a manera de pseudorosetas. En otras áreas el tumor se acompaña de extensas zonas de necrosis de coagulación. En estas zonas se aprecian grupos de células más pequeñas de núcleos muy oscuros (Fig. 3, flechas). Las tinciones para retículo revelan escasas fibras reticulares asociadas con trabéculas fibrosas o alrededor de los vasos capilares de soporte del tumor, pero no se encuentran asociadas ni con células individuales ni rodean grupos celulares. Con la tinción de P.A.S en algunas células se observan abundante material P.A.S positivo en el citoplasma (Fig. 4).

Microscopio Electrónico:

Las células tumorales de la biopsia se identificaron mediante comparación con secciones gruesas teñidas con Azul de Toluidina. Las células individuales muestran poca irregularidad en su forma, presentan poco citoplasma y se encuentran separadas por fibras colágenas (Fig. 5). Las membranas celulares aparecen formadas por una sola capa y no se encuentran rodeadas por material de membrana basal. Entre algunas células es posible observar complejos de unión de tipo desmosómico con una densidad electrónica mayor en el citoplasma subyacente (Fig. 5, flechas). Algunas células presentan proyecciones citoplásmicas de tipo microvellosidades (Fig. 7). El citoplasma presenta abundantes gránulos agrupados que corresponden a partículas de glicógeno de moderada densidad electrónica como se observa en la figura 6 (Flechas). Las mitocondrias son pequeñas y muchas tienen forma redonda. Muchas de las células carecen de complejos

de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso aparece dilatado. Las células pequeñas de núcleos oscuros observadas en las áreas de necrosis con el microscopio de luz, corresponden a células muy irregulares con núcleos que contienen una cromatina dispersa y en grumos y de alta densidad electrónica, presentando además procesos citoplásmicos que se extienden en medio de las otras células adyacentes. El citoplasma de estas células es escaso y no contiene gránulos de glicógeno en comparación con el de las células claras. El núcleo de las células claras presenta ocasionalmente invaginaciones de la membrana y pequeñas estructuras de tipo gránulo-filamentoso (Fig. 6, flechas anchas).

DISCUSION:

En sus estudios originales, Ewing describe un tumor del hueso que él creía se originaba de diversos tipos celulares que caracterizó como células endoteliales ya fuera que se encontraran revistiendo vasos sanguíneos, linfáticos, o endotelio perivascular y sinusoidal del retículo linfoide, basándose en la observación frecuente de la invasión o infiltración de los vasos por parte del tumor (5, 6). El examen cuidadoso de secciones finas del tumor de Ewing revelan que las células neoplásicas no tienen la capacidad de formar vasos o canales vasculares, sino que muestran alto grado de angioinvasión. Los estudios ultraestructurales de tumores vasoformativos, angiomatosos y del tipo hemangiopericitoma, muestran células rodeadas por abundante material de membrana basal y las células contienen numerosas vesículas picnócíticas y "cuerpos de anclaje" (13, 16, 20, 25). La ausencia de estas características ultraestructurales en los tumores de Ewing estudiados previamente con el microscopio electrónico y su confirmación en nuestro estudio no apoyan un origen vascular para el tumor de Ewing (9, 10, 11, 12, 27). Algunos autores han especulado que la célula de origen del tumor de Ewing deriva del sistema reticuloendotelial o directamente de células reticulares presentes en la médula ósea (14, 15, 26). La ultraestructura de reticulosarcomas humanos, de animales de experimentación, así como los estudios comparativos entre linfomas histiocíticos y tumor de Ewing muestran células semejantes y en ambos es posible observar dos diferentes tipos celulares: una célula caracterizada por un citoplasma claro y otra con un citoplasma y núcleo muy denso a los electrones (10, 12, 28), denominada célula oscura. Weinberger y Bandfield (28), interpretan estas células oscuras presentes en los reticulosarcomas como células que se encuentran en proceso de degeneración y la misma interpretación la hacen Kadin y Bensch en la ultraestructura del tumor de Ewing (12). Estas células de densidad electrónica mayor y de tipo reticular fueron originalmente descritas en el tumor de Ewing por Friedman y Gold (9), quienes sugieren que se tratan de células tumorales en proceso de maduración. Posteriormente Friedman y Hanaoka las interpretan como células tumorales maduras, a diferencia de las células más claras que consideran como de transición (10). Recientemente han sido también observadas por Jensen et al (11), con procesos citoplásmicos alargados que se disponen en medio de las células de tipo claro y ellos las interpretan como células reaccionales de origen del estroma del tumor. En nuestro estudio la presencia de células oscuras se observó principalmente en las zonas de necrosis observándose en las células claras a su alrededor signos francos de necrosis, como se observa en la figura 7, lo que nos induce a creer que se trate de las mismas células tumorales en proceso de degeneración y no células en maduración ni provenientes del estroma, apoyando de esta forma las observaciones previas de Weinberger y Kadin (12, 28). La presencia de complejos de unión de tipo desmosómico descritos inicialmente por Jensen (11), en el tumor

de Ewing, se confirman en nuestro estudio, observándose además procesos de tipo microvellosidades, que aunque clásicamente descritos en células de origen epitelial, no contribuyen a su histogénesis pues han sido observadas también en células de otras entidades entre ellas los linfomas. Aparte del interés histogénético, el estudio del tumor de Ewing empleando la microscopía electrónica, ha ayudado a establecer la morfología de la célula principal de este tumor. El citoplasma claro y escaso que se observa con el microscopio de luz es debido posiblemente a la presencia de pocas organelas, como se observa en las micrografías electrónicas, en donde es difícil identificar complejos de Golgi, el retículo endoplásmico es escaso, lo mismo que las mitocondrias, indicarlo que posiblemente la célula del tumor de Ewing no se encuentra involucrada en la síntesis proteica. Las membranas celulares que generalmente no son visibles con el microscopio de luz, se presentan formadas por una sola capa muy delgada e incompleta a diferencia de la constitución trilaminar de la mayoría de las membranas plasmáticas. Se confirma la presencia de glicógeno particulado en el citoplasma de la mayoría de las células del tumor de Ewing, fenómeno que ya había sido observado por Schajowicz (24), quien identificó las partículas de glicógeno con la técnica de P.A.S y aunque histoquímicamente el glicógeno se ha logrado identificar también en los linfomas (10), su elevado contenido en el tumor de Ewing, tanto en las células del tumor como en las células obtenidas por cultivo de tejidos (12), ha servido como hecho diagnóstico para diferenciarlo de otros tumores especialmente de los linfomas de tipo histiocítico. El significado de la presencia de glicógeno abundante en las células del tumor de Ewing no tiene explicación al momento. El glicógeno se encuentra presente en forma normal en células hepáticas, del cartílago y del músculo, así como en otras localizaciones en menor cantidad, en donde en forma normal es utilizado para su degradación a glucosa y a su vez ser utilizado por la célula para la síntesis de otras sustancias tales como mucopolisacáridos ácidos como ocurre en el caso del cartílago, o bien es liberada al torrente sanguíneo como ocurre con el hígado. La capacidad de glicogenesis por parte de células neoplásicas es baja, inclusive en las células de hepatomas bien diferenciados, por lo que su presencia en el tumor de Ewing así como linfomas aunque en mucho menor cantidad hace pensar de que el tumor de Ewing bien podría representar una forma especial de linfoma histiocítico.

R E S U M E N

Se presenta un caso de un tumor de Ewing estudiado con el microscopio electrónico. Se encuentran células de dos tipos: células claras y células oscuras, ambas con escaso citoplasma y pocas organelas, unidas por complejos de unión de tipo hemidesmosomas. Se observa un nuevo hallazgo no descrito previamente y que consiste en la presencia de microvellosidades en algunas células claras y que además muestran numerosos gránulos de glicógeno ya descritos previamente, encontrándose además fibras colágenas en el espacio intercelular. La ultraestructura de las células tumorales apoya la hipótesis de que el tumor de Ewing es una entidad aparte de las neoplasias de origen vascular, no pudiéndose descartar del todo un origen linforeticular. Se observaron estructuras de tipo granulofilamentoso en los núcleos de algunas de las células claras, cuyo significado queda por dilucidar y que podrían representar estadios en el desarrollo de algún virus.

S U M M A R Y

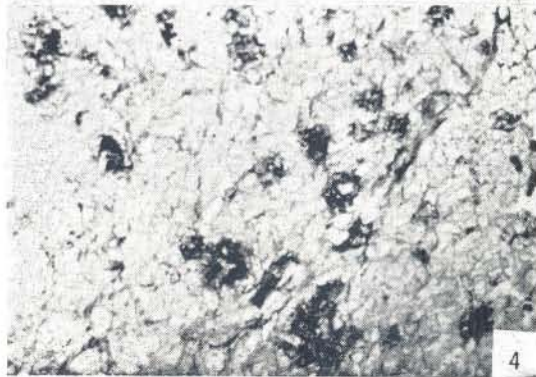
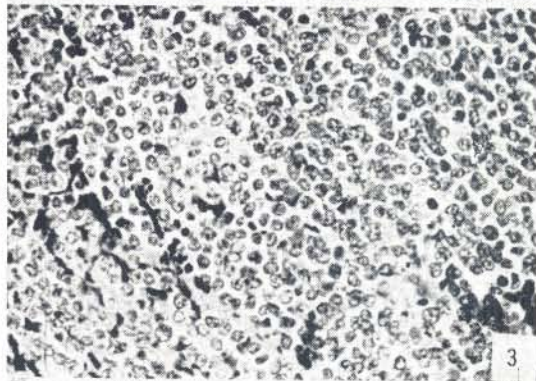
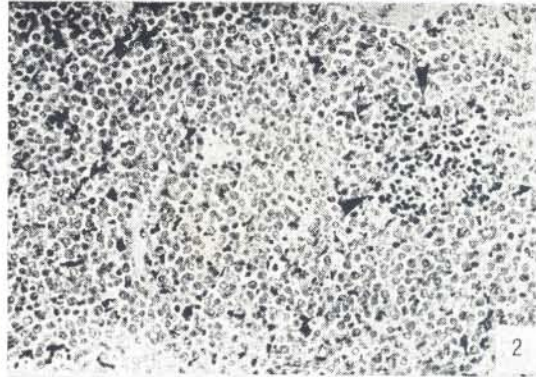
A Ewing's tumor was examined by electron microscopy. Two different types of cells were identified: clear cells and dark cells. A pale cytoplasm with scanty organelles characterized the clear cells. Junctional complexes of hemidesmosomes type were observed, as well as microvilli in some clear cells. This last finding has not been previously described. The presence of numerous glycogen granules in the cytoplasm of the clear cells confirms previous observations and intercellular collagen fibrils were present. The ultrastructural observations in the tumor cells supports the hypothesis that Ewing's tumor is a separate entity different from the vascular neoplasms, although a lymphoreticular origin cannot be ruled out. Granulo-filamentous structures were present in the nuclei of some clear cells, and its significance is unknown at the moment. They could represent different stages in the development of a virus.

Fig. 1.—Radiografía del fémur que muestra ensanchamiento de la cavidad medular con bordes internos irregulares y aspecto poroso del hueso cortical.

Fig. 2.—Tumor de Ewing compuesto por células redondas de escaso citoplasma con un patrón monomórfico. Las cabezas de flecha indican un grupo de células de núcleos pequeños y oscuros en una zona de necrosis temprana. (H & E 250 X).

Fig. 3.—Grupos de células tumorales caracterizadas por núcleos redondos, algunas con nucléolos prominentes y escaso citoplasma. (H & E 400 X).

Fig. 4.—Tumor de Ewing. Tinción de P. A. S. que muestra grupos de células con abundante material P. A. S. positivo en el citoplasma. (Tinción de P. A. S. 400 X).



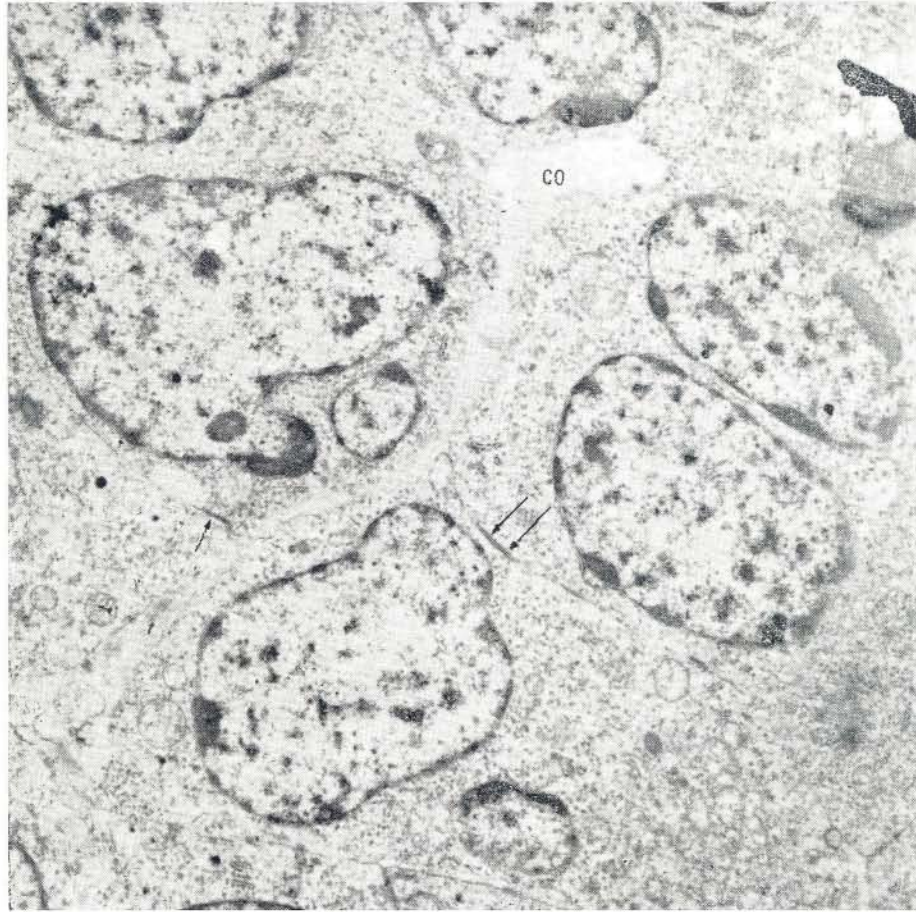


Fig. 5.—Micrografía electrónica de un tumor de Ewing mostrando varias células de citoplasmas escaso. Las flechas señalan complejos de unión de tipo desmosómico. Se observa también tejido colágeno intercelular (CO). El citoplasma contiene mitocondrias y gránulos finos. (Acetato de uranilo y citrato de plomo 10.000 X).



Fig. 6.—Micrografía electrónica de una célula de un tumor de Ewing. El citoplasma contiene abundantes gránulos densos (flechas) que corresponden a partículas de glicógeno. El núcleo es redondo con la cromatina marginada y contiene material gránulo filamentosos (flechas gruesas). Se aprecia colágeno intercelular. (CO). (Acetato de uranilo y citrato de plomo. 20.000 X).

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BARDEN, R. P.
The similarity of clinical and roentgen findings in children with Ewing's sarcoma (endothelial myeloma) and simpathetic neuroblastoma. *Amer. J. Roentgen.* 50:575, 1943.
- 2.—BIAVA, C.
Identification and structural forms of human particulate glycogen. *Lab. Invest.* 12: 1179, 1963.
- 3.—COLVILLE, H. C., AND WILLIS, R. A.
Neuroblastoma metastasis in bone, with criticism of Ewing's endothelioma. *Amer. J. Path.* 9:421, 1933.
- 4.—DAHLIN, D. C., COVENTRY, M. B., & SCANLON, P. W.
Ewing's sarcoma. A critical analysis of 165 cases. *J. Bone Joint. Surg.* 43 A: 185, 1965.
- 5.—EWING, J.
Diffuse endothelioma of bone. *Proc. N. Y. Path. Soc.* 21:17, 1921.
- 6.—IDEM.
Further report on endothelial myeloma of bone. *Proc. N. Y. Path. Soc.* 24:93, 1924.
- 7.—FALK, S., AND ALPERT, M.
Five year survival of patients with Ewing's sarcoma. *Surg. Gynec. Obstet.* 124:319, 1967.
- 8.—FERNANDO, N. V. P., AND MOVAT, H. Z.
The fine structure of the terminal vascular bed. III. The capillaries. *Exp. Mol. Pathol.* 3:87, 1964.
- 9.—FRIEDMAN, B. H., AND GOLD, H.
Ultrastructure of Ewing's sarcoma of bone. *Cancer.* 22:307, 1968.
- 10.—————. AND HANAOKA, H.
Round cell sarcomas of bone. A lighth and electron microscopic study. *J. Bone. Joint Surg.* 53 A: 1117, 1971.
- 11.—JENSEN, H. K. PRIORI, E., AND DMOCHOWSKI, L.
Studies on ultrastructure of Ewing's sarcoma of bone. *Cancer.* 29:280, 1972.
- 12.—KADIN, M. D., AND BENCH, K. J.
On the origin of Ewing's tumor. *Cancer.* 27:257, 1971.
- 13.—KUHN, C., AND ROSAI, J.
Tumor arising from pericytes. Ultrastructure and organ culture of a case. *Arch. Pathol.* 88:653, 1969.
- 14.—LICHTENSTEIN, L. & JAFFE, H. L.
Ewing sarcoma of bone. *Amer. J. Path.* 23:43, 1947.
- 15.—MC CORMACK, L. J., DOCKERTY, M. B. & GHORMLEY, R. K.
Ewing sarcoma. *Cancer.* 5:85, 1952.
- 16.—MURAD, T. M., VON HAAM, E., AND MURTHY, M. S. N.
Ultrastructure of an hemangiopericytoma and a glomus tumor. *Cancer.* 22:1239, 1968.
- 17.—OBERLING, C.
Les reticulosarcomes et les reticuloendotheliosarcomes de la moelle osseuse (sarcomes de Ewing). *Bull. Ass. Franc. Cancer.* 17:259, 1928.

- 18.—————. AND RAILEANU, C.
Nouvelles recherches sus les reticulosarcomes de la moelle osseuse (sarcomes de Ewing). Bull. Ass. Franc. Cancer. 21:333, 1932.
- 19.—OKANO, H., AZAR, H. A. AND OSSERMAN, E. F.
Plasmocytic Reticulum Cell Sarcoma. Case report with electron microscopic studies. Am. J. Clin. Pathol. 46:546, 1966.
- 20.—RAMSAY, H. J.
Fine structure of hemangiopericytoma and hemangioendothelioma. Cancer. 19:2005, 1966.
- 21.—REYNOLDS, E. S.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17:208, 1963.
- 22.—ROOME, N. W., AND DELANEY, P. A.
Undifferentiated round cell sarcomas of the ileum (Ewing tumor), containing hemo-poetic elements. Am. J. Cancer. 16:386, 1932.
- 23.—SCHAJOWICZ, F., AND CABRINI, R. L.
Histochemical studies of bone in normal and pathological conditins. J. Bone. Joint Surg. 36 B: 474, 1954.
- 24.—————.
Ewing's sarcoma and reticulum cell sarcoma of bone with special reference to the histo-chemical demonstration of glycogen as an aid to the differential diagnosis. J. Bone. Joint Surg. 41 A: 349, 1959.
- 25.—STEINER, G. C., DORFMAN, H. D.
Ultrastructure of hemangioendothelial sarcoma of bone. Cancer. 29:122, 1972.
- 26.—STOUT, A. P.
A discussion of the pathology and histogenesis of Ewing's tumor of bone marrow. Am. J. Roentgenol. 50:334, 1943.
- 27.—TAKAYAMA, S., ET AL.
Electron microscopic observations of Ewing's sarcoma. A case report. Acta Path. Jap. 20:87, 1970.
- 28.—WEINBERGER, M. A., AND BANFIELD, W. F.
Fine structure of a transplantable Reticulum Cell Sarcoma: I. Light and Electrol Microscopy of Viable and necrotic tumor cells. J. Natl. Cancer. Inst. 34:459, 1965.
- 29.—WILLIS, R. A.
Metastatic neuroblastoma in bone presenting the Ewing syndrome, with a discuss ion of "Ewing's sarcoma". Amer. J. Path. 16:317, 1940.