

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

"NATURALEZA NEURONAL DE LOS NEUROBLASTOMAS DE
LA CLASIFICACIÓN DE DEL RÍO HORTEGA DEL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL. ESTUDIO CON TÉCNICAS
ARGÉNTICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS".

Trabajo de Tesis para optar al
Título de Doctor en Medicina y Cirugía

Mónica Viviana Herrero

CÓRDOBA
REPÚBLICA ARGENTINA
2015

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS:

DIRECTOR:

Profesor Doctor Hugo Arturo Cejas

INTEGRANTES:

Profesor Doctor Ricardo E. Fretes

Profesor Doctor Carlos Federico Buonanotte

Artículo 30° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía: “LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS”

DEDICATORIAS

A mi marido Roal,

A mis hijos Gonzalo y Natalia,

A mi madre Zully,

A mis hermanos,

A la memoria de mi padre José

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. Hugo Arturo Cejas, mi maestro, por su amor incansable a la patología en general y especialmente por su dedicación en neuropatología, que con su gran experiencia, constante estímulo y motivación, hizo posible que reviviera en nuestro trabajo maestros de la patología mundial.

A la Profesora Adelaida Rodríguez, por su acompañamiento en la vida y especialmente en este trabajo, con sus reflexiones, aportes y amorosa dedicación.

Al Profesor Doctor Ricardo Fretes por sus alentadores aportes.

Al Profesor Doctor Federico Buonannote por su grata colaboración.

A las Señoras Médicas Teresita Filli y Patricia Moreno por su invaluable contribución casuística.

A la Señora Médica Gabriela Moyano Crespo por su intervención en el análisis estadístico.

Al Señor Médico Daniel Tello Roldán por su contribución en la traducción del Resumen al idioma inglés.

A las Señoras Médicas del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Córdoba por su desinteresado apoyo y dedicación.

A las Señoras Médicas Mónica Matsuzaki y Valeria Manrique por su apoyo constante en mis momentos de máximo trabajo.

ABREVIATURAS

- SNC: Sistema nervioso central
- Pe: Por ejemplo
- SNP: Sistema nervioso periférico
- Etc.: Etcétera
- MAPs: Proteínas asociadas a microtúbulos
- GFAP: Proteína gliofibrilar ácida
- SN: Sistema nervioso
- OMS: Organización mundial de la salud
- Syn: Sinaptofisina
- MAP2c: Proteína asociada a microtúbulos 2
- MAP1b: Proteína asociada a microtúbulos 5
- Hosp.: Hospital
- H-E: hematoxilina-eosina
- AgO: Plata metálica
- Lab.: Laboratorio
- Proced.: Procedencia
- Localiz.: Localización
- EE: Error estándar
- Arg: Tinción argéntica
- Col.: Colaboradores
- VM: Velo medular
- CGE.: Capa granular externa
- PCNA/ciclina: proliferación celular nuclear antígeno ciclina

INDICE

RESUMEN	8
SUMMARY	9
I. INTRODUCCIÓN	10
I.1. Generalidades	11
Antecedentes de la controversia meduloblastoma/neuroblastoma	12
I.2. Embriología	16
I.3. Histología	20
La Neurona	21
Técnicas argénticas para el estudio de neuronas	29
Neuroglía	32
I.4. Anatomía patológica de los neuroblastomas de cerebelo.....	35
I.5. Clasificación de los tumores del Sistema Nervioso Central	37
Comentario Histórico de las clasificaciones	37
Clasificación de Bailey	38
Clasificación de Del Rio Hortega-Polak	41
Clasificación OMS	42
I.6. Objetivos	44
II. MATERIALES Y MÉTODOS	45
II.1. Materiales	46
II.2. Métodos	48
II.2.1. Fundamentos de técnicas de impregnación argénticas	49
II.2.2. Técnicas argénticas	51
II.2.3. Fundamento de técnica inmunohistoquímica	57

II.2.4. Técnica inmunohistoquímica	58
II.2.5. Anticuerpos para uso de inmunohistoquímica	59
II.3. Infraestructura	60
II.4. Análisis estadístico	60
II.5. Nota	61
III. RESULTADOS	62
III.1. Descripción del grupo de estudio	63
III.2. Estudio según el género y edad.....	66
III.3. Clínica y hallazgos.. morfológicos	70
III.3.1. Clínica	70
III.3.2. Descripción macroscópica	70
III.3.3. Descripción microscópica. H-E	72
III.3.4. Microscopía con técnicas argénticas	83
III.3.5. Perfil de inmunohistoquímica	89
IV. DISCUSIÓN	98
IV.1. Conceptos histogenéticos y comparación entre métodos	99
IV.2. Modificación técnica	108
IV.3. Análisis de las distintas clasificaciones	109
IV.4. Conclusiones	111
V. BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXO	125
Certificaciones	125
Presentación	127

RESUMEN

El objetivo fue demostrar que los llamados meduloblastomas del Sistema Nervioso Central son neuroblastomas, tumores de origen neural con identidad propia.

Siguiendo a Del Río Hortega y Polak se estudiaron 33 meduloblastomas cerebelares clínica y anatomopatológicamente demostrados.

Se utilizaron técnicas de anilinas, impregnación argéntica y de inmunohistoquímica.

Se analizó extensamente la bibliografía haciendo énfasis en el origen e histogénesis de las neuronas. Se tuvo en cuenta un principio básico que para reconocerlas se debe teñir el núcleo, el citoplasma y sus prolongaciones.

Con las técnicas habituales de hematoxilina- eosina se observa sólo el núcleo y citoplasma, con la inmunohistoquímica se caracteriza la estirpe y con las técnicas argénticas las prolongaciones, con las que Cajal, Del Río Hortega, Golgi y otros estudiaron y descubrieron las células del SNC normal y patológico, cuya teoría de la neurona de Cajal no fue superada hasta la actualidad.

Siguiendo a Del Río Hortega se utilizó su clasificación y técnicas de impregnación argéntica para estos blastomas y se los comparó con las técnicas de anilinas habituales e inmunohistoquímica, métodos con los cuales se trató de demostrar la hipótesis planteada.

Las células observadas en estos tumores con las técnicas habituales fueron diagnosticadas como meduloblastomas, con las técnicas de inmunohistoquímica se demuestra el fenotipo neuronal, con las técnicas de impregnación argéntica estas células tienen neurofibrillas e imágenes histológicas de las neuronas y sus progenitores, neurona, neuroblasto y neuroepitelio.

Por lo tanto se concluyó, igual que demostraron otros autores, que las células de estas neoplasias son de diferenciación neuronal.

Se propone una modificación técnica para material incluido en parafina.

SUMMARY

The purpose of this study was to demonstrate that the called medulloblastoma of the central nervous system, are neuroblastomas, tumors of neural origin with its own identity .

Following the published studies from Del Rio Hortega and Pollak, we studied 33 cerebellar medulloblastoma, clinically and pathologically demonstrated

We used silver, aniline stains and immunohistochemistry.

A comprehensive literature review was conducted, with emphasis on the origin and histogenesis of neurons. A basic principle was considered to recognize a neuron, the nucleus, the cytoplasm and the neuronal extensions must be stained.

With standard hematoxylin and eosin techniques we only observed the nucleus and the cytoplasm. The immunohistochemistry showed the cell line origin and the silver stain make evident the neuronal extensions. Del Rio Hortega, Cajal, Golgi and others discovered and studied the normal and pathological central nervous system cell. The Cajal's neuron theory was unsurpassed even today.

We used, to study these blastomas, the Del Rio Hortega's classification and silver stain technique, and we used those to compare with the usual aniline and immunohistochemical techniques. This was the method we use to prove our hypothesis.

The cells observed in these tumors, were diagnosed as medulloblastomas using standard staining techniques. The neuronal cell phenotype was demonstrated using immunohistochemical techniques. Silver-staining procedures was used to reveal the presence of neurofibrils, the histological images of neurons and their progenitors, neuron, neuroblast and neuroepithelium

We can conclude, in the same way as other authors did, that this neoplastic cells have neuronal differentiation.

We propose a technical modification, to demonstrate the cells in a paraffin embedded tissue.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I-1 GENERALIDADES

El Neuroblastoma del Sistema Nervioso Central (SNC), es uno de los tumores malignos más frecuentes en los niños.

El concepto de neuroblastoma del SNC fue sostenido por Pío del Río Hortega y Moisés Polak en 1960, para referirse a los tumores malignos de origen neuronal, localizados en el cerebelo (1, 2).

Otros autores apoyan la existencia del meduloblastoma, tumor maligno de los niños, de localización cerebelar, pero con histogénesis dual: neuronal y glial. Tiene un pico de incidencia en la niñez entre los 5 a 10 años. Constituye el 25% de los tumores cerebrales en niños y el 40% en fosa posterior. Es raro en los adultos. Predomina en sexo masculino (3, 4, 5, 6).

La controversia del origen dual fue rebatida por Del Río Hortega al afirmar lo siguiente:

“La gran mayoría de los tumores llamados meduloblastomas son potencial o realmente neuroblastomas, algunos de ellos son potencial o realmente glioblastomas isomorfos, y ninguno de los elementos ofrece la bipotencialidad o ambigüedad que le son atribuidos.” Pío del Río Hortega 1932 (1).

Los tumores originalmente descritos como neuroblastomas, fueron estudiados con técnicas de impregnación argéntica por Pío Del Río Hortega, quien observó las semejanzas morfológicas entre las células neoplásicas y las células embrionarias precursoras de las neuronas. Esta disparidad entre los conceptos de Del Río Hortega y los otros autores, existe hasta nuestros días. Tuvo su origen en la descripción de la célula denominada “meduloblasto” por Bailey y Cushing, e incorporan al meduloblastoma a la primera clasificación de Tumores del Sistema Nervioso Central, hecha por estos autores en 1926 (3, 7). Cabe destacar que los estudios histopatológicos realizados por ellos, eran con técnicas de anilinas y otras, todas insuficientes para demostrar células neoplásicas neuronales con sus prolongaciones.

Las importantes descripciones de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía, normales y patológicas aportadas por Golgi, His, Cajal, Del Río Hortega y otros autores, con la metodología de las impregnaciones argénticas, aún están vigentes.

Estos investigadores nunca observaron “meduloblastos”, por eso en la Clasificación de Tumores del SNC de Del Río Hortega de 1934, no existe el “meduloblastoma” (1, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

En las últimas Clasificaciones de Tumores del SNC, el meduloblastoma aún persiste y el neuroblastoma es considerado como una neoplasia excepcional en el SNC.

Un gran desafío es contribuir a desentrañar esta controversia.

El estudio morfológico comparativo de neuroblastomas cerebelares con técnicas de impregnación argéntica y con las nuevas metodologías Bio-moleculares que nos aporta la inmunohistoquímica, podría clarificar y replantear la histogénesis de estos tumores con proyección a la verdad científica, a la posibilidad de un nuevo tratamiento y a la reclasificación de los tumores del SNC (14, 15, 16, 17). En síntesis es esto lo que intenta clarificar esta tesis.

ANTECEDENTES DE LA CONTROVERSIA MEDULOBLASTOMA-NEUROBLASTOMA

Las modificaciones embriológicas del ectodermo llevan a la formación de la placa, canal y tubo neural. Las células que tapizan el tubo neural fueron estudiadas por His y confirmadas por Cajal, quien empleando el método de Golgi obtuvo mejores resultados. Posteriormente Golgi, Koelliker, Schaper y otros contribuyeron en el conocimiento de la embriogénesis del sistema nervioso, con sus aportes a la gran obra de His y Cajal (8, 9, 13). El epitelio que tapiza el tubo neural primitivo está constituido por células prismáticas bien delimitadas. Entre estas células aparecen corpúsculos esféricos en mitosis denominadas por His “células germinativas”, de las que se originan exclusivamente neuroblastos. Y denominó espongioblastos a las células

epiteliales primitivas capaces de originar epitelio endodiverticular y neuroglia (2).

A pesar de ello no todos los autores coincidieron con que esta diferenciación en neuroblástica y neuroglial sea tan temprana.

- Así Schaper considera a las células prismáticas como elementos neuroepiteliales indiferenciados y a las células germinativas como a los mismos elementos anteriores en mitosis las cuales dan nuevas células neuroepiteliales y células indiferentes apolares, las que por mitosis producirán nuevas generaciones de células indiferenciadas o diferenciadas en neuroblastos y espongioblastos (2).

- Más tarde Cajal al estudiar la formación de la neuroglia en las fases más tempranas, con claridad genial destruye los elementos indiferenciados de Schaper diciendo que los elementos de neuroglia no son otra cosa que células epiteliales dislocadas y transformadas (8, 9).

- Para de Del Río Hortega del neuroepitelio primitivo constituido por espongioblastos y células germinales se diferencian dos géneros de elementos: glioblastos y neuroblastos. Los glioblastos se desprenden y emigran del tubo neural para convertirse algunos en astroblastos y otros en oligodendroblastos (2).

- Bailey y Cushing, de la Universidad de Chicago, con gran experiencia en neuropatología, y autores de la primera clasificación de tumores nerviosos admiten tres tipos celulares en las fases iniciales del tubo neural: espongioblastos primitivos, neuroblastos y meduloblastos, término con el cual fue rebautizado a las “células indiferentes de Schaper”, surgiendo el término de meduloblastomas (3).

- Los conceptos de la escuela española fueron aceptados por otros autores como Stevenson y Echlin (18). La importancia de los mismos es que confirman la individualidad histogenética de las células germinales y de los espongioblastos, que se mantiene a lo largo de sus sucesivas evoluciones hasta llegar a la neurona o a la célula glial o a la epitelial endodiverticular

diferenciada. Es decir no hay transición o bipotencialidad entre ambas líneas evolutivas.

- Según el concepto de Shaper de la célula indiferenciada, a la que Bailey denominó meduloblasto, justificó así la existencia de algunos tumores del SNC que no esbozaban diferenciación glial o neuronal. Varios investigadores trataron de probar su existencia por estudios embriológicos y de cultivo (19).

- Penfield consideraba que del epitelio neural primitivo derivan espongioblastos y neuroblastos y haciendo referencia a las células indiferenciadas dice: “yo no he visto jamás un meduloblasto y no puedo por lo tanto reconocer a esta célula en un tumor, aún cuando numerosos patólogos hablan con facilidad acerca del meduloblasto, derivando sus conocimientos embriológicos del tejido neoplásico” (20).

En los tumores que forman parte de nuestra colección- sigue diciendo Penfield- jamás encontré meduloblastos y la morfología del meduloblasto en el sistema nervioso es desconocida” (2, 20).

-Para Bailey y Cushing los meduloblastos son células esféricas rodeadas de escaso citoplasma en forma de anillo o alargado.

La disposición de estas células en tejido tumoral, para Bailey y Cushing, es en grupos pseudoadenomatosos, pseudorosetas o en columnas. Dicen estos autores:

“Tanto neuroblastos como espongioblastos pueden encontrarse en dichos tumores y es probable que las células que los componen sean bipotenciales y representen un estadio del desarrollo correspondientes a las células indiferenciadas de Schaper o, en otras palabras, a las que denominamos meduloblastos”. “Los meduloblastomas están constituidos fundamentalmente por meduloblastos, entre los que pueden diferenciarse neuroblastos, espongioblastos o los dos tipos de células” (7).

-Para Polak el meduloblasto fue creado para salvar una dificultad diagnóstica y Penfield al describir los meduloblastomas dice: “La denominación fue sugerida por el convencimiento de que las células constitutivas eran

indiferenciadas, capaz de evolucionar en neuroblastos o en espongiblastos, porque aparentemente se observaron neuroblastos en estos tumores (2).

- Posteriormente Elvige, Penfield y Cone admiten la bipotencialidad de células neoplásicas, con disposición arquitectural en pseudorosetas.

Ante la falta de base científica de la teoría bipotencial y ante la falta de convencimiento de la existencia de los meduloblastos, estos autores concluyen diciendo: "Estas células pueden ser denominadas meduloblastos, pero debe recordarse que estas células indiferenciadas y bipotenciales tienen una existencia puramente teórica en el embrión".

- Kershman no encuentra células bipotenciales en cerebro ni en médula (4).

- Del Río Hortega no menciona en su clasificación al meduloblastoma porque basado en los estudios de Cajal en material normal y en los propios de Del Río Hortega en material patológico, demuestra la inexistencia del así llamado meduloblasto y de toda otra célula bipotencial. Además numerosos casos diagnosticados por otros patólogos como meduloblastomas, demuestra que la mayoría eran neuroblastomas o glioblastomas isomorfos y a veces oligodendroblastomas (21, 22, 23).

Según Del Río Hortega la época del conocimiento de los blastomas intracraneales se inauguró con los estudios de Bailey y Cushing con su obra clásica el libro sobre los tumores del grupo de los gliomas en 1926. Aunque Bailey expresó numerosos cambios de criterio y con limitaciones de las técnicas empleadas. Describen al meduloblastoma como tumores embrionarios con capacidad de diferenciación bipotencial neuronal/glial, que luego fueron históricamente adaptadas por miembros de la escuela anglo-americana (3, 4, 5). Emplearon técnicas argénticas de Cajal, Achucharos y Del Río Hortega, las que al ponerlas en práctica, partieron de la suposición de que las células neoplásicas tienen reacciones colorantes análogas a las de las nerviosas y neuróglías, pero las imágenes obtenidas no fueron satisfactorias.

Durante la década de 1920 a 1930 las Clasificaciones de los Tumores del SNC estuvieron basadas en las tradiciones científicas nacionales, las cuales

fueron delineadas y circunscriptas de acuerdo con sus propios conocimientos metodológicos, científicos y demostradas por imágenes microscópicas obtenidas con técnicas limitadas. Así, la escuela alemana aplicó las técnicas de reticulina, lo que derivó, entre otras deducciones en una exagerada y errónea interpretación de “tumores infiltrantes” en las leptomeninges, como “sarcomas gliales” (11, 12).

I-2 EMBRIOLOGÍA

Como las neoplasias indiferenciadas representan morfológicamente las células desdiferenciadas es necesario conocer como son, por esto es que seguimos con la descripción embriológica e histológica haciendo hincapié en las neuronas.

El desarrollo de las células del parénquima del SNC, comienza a los 17^o-18^o días de gestación con la aparición de un engrosamiento en el ectodermo, es la placa neural. En los días sucesivos, se forma el surco neural, y en el día 21 se cierra formando el tubo neural (figuras 1 y 2). His estudió el epitelio del tubo neural, donde hay células prismáticas bien delimitadas, luego aparecen unas células esféricas, en mitosis, son las células germinativas que continúan su evolución hasta convertirse en neuroblastos, neurocitos y finalmente en neuronas.

El resto de las células prismáticas se transforman en espongioblastos células voluminosas con prolongaciones, que van a dar origen a dos tipos celulares: unas migran hacia la periferia, se diferencian en glioblastos, astroblastos, oligodendroblastos y finalmente en astrocitos fibrosos y protoplasmáticos y en oligodendrocitos. Otras quedan en el tubo neural y forman el epitelio epéndimo-ventricular.

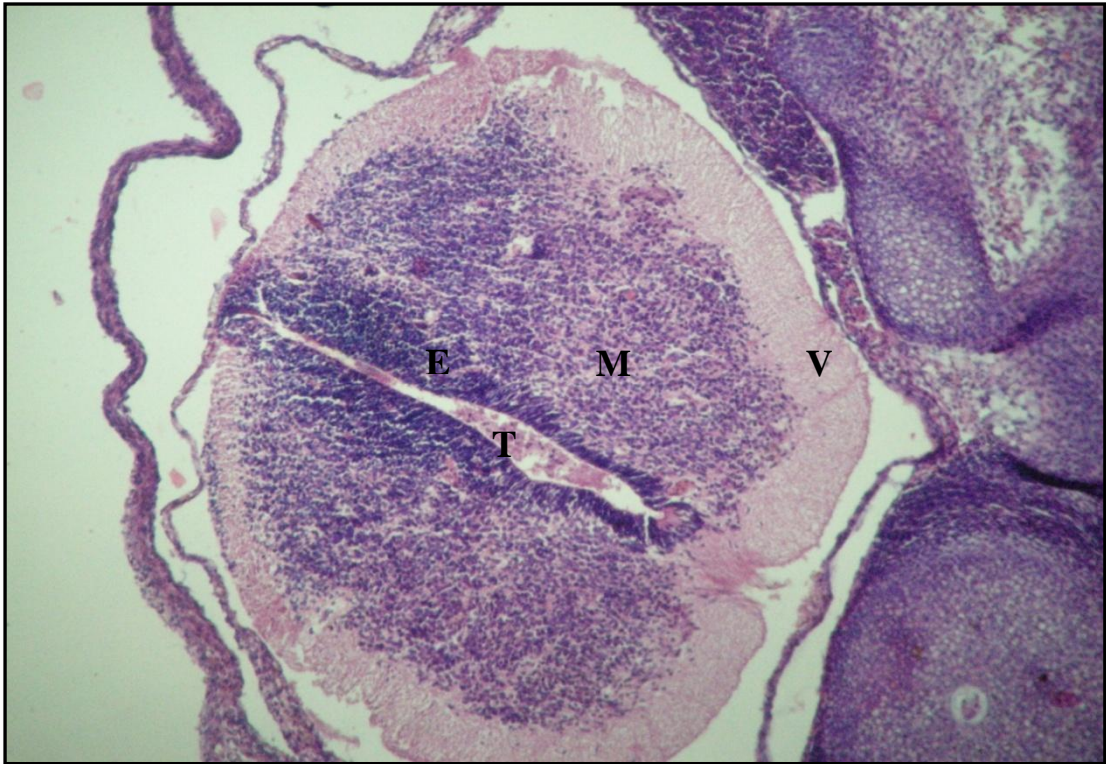


Figura 1: Microfotografía: tubo neural en embrión humano de 6 semanas. T: tubo neural, E: Capa ependimaria, M:Capa del manto, V:Capa marginal. Hematoxilina-Eosina H-E 10X.

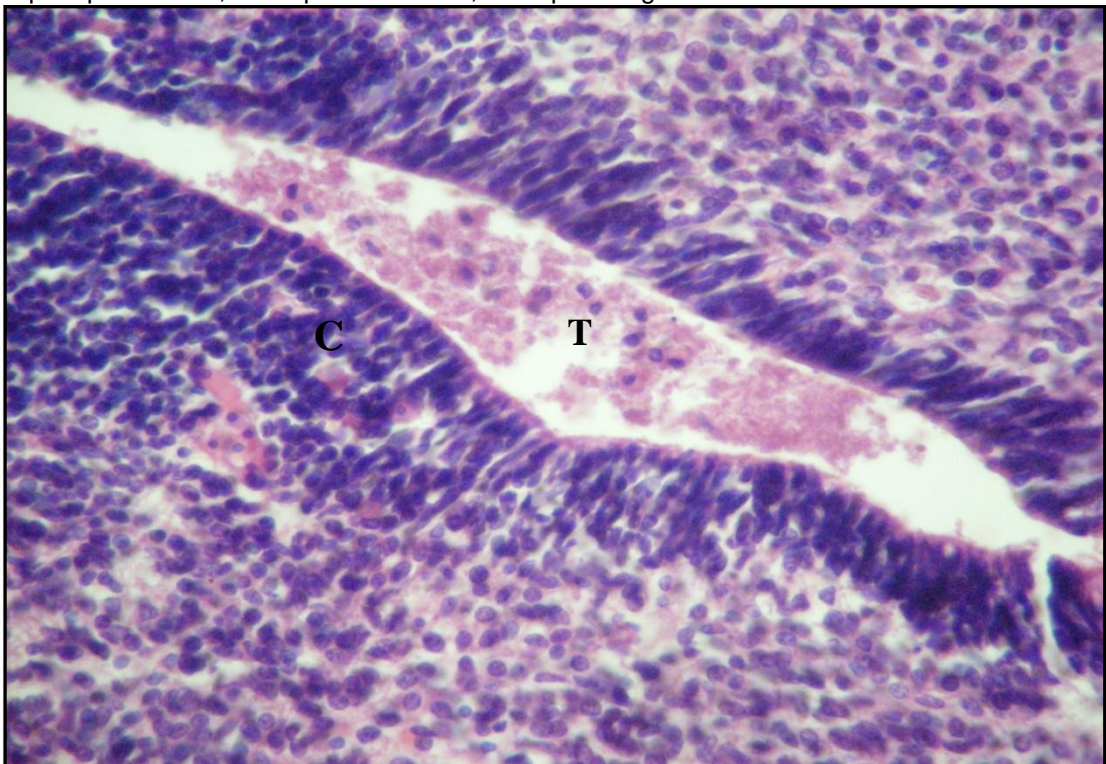


Figura 2: Microfotografía, tubo neural (T) en embrión humano de 6 semanas. C: Células germinativas. H-E 40X.

En la diferenciación neuronal, desde el epitelio primitivo y las células germinales, los neuroblastos observados por Hardestey en embriones humanos se desplazan desde la capa del manto hacia el velo marginal (14) (figura 3).

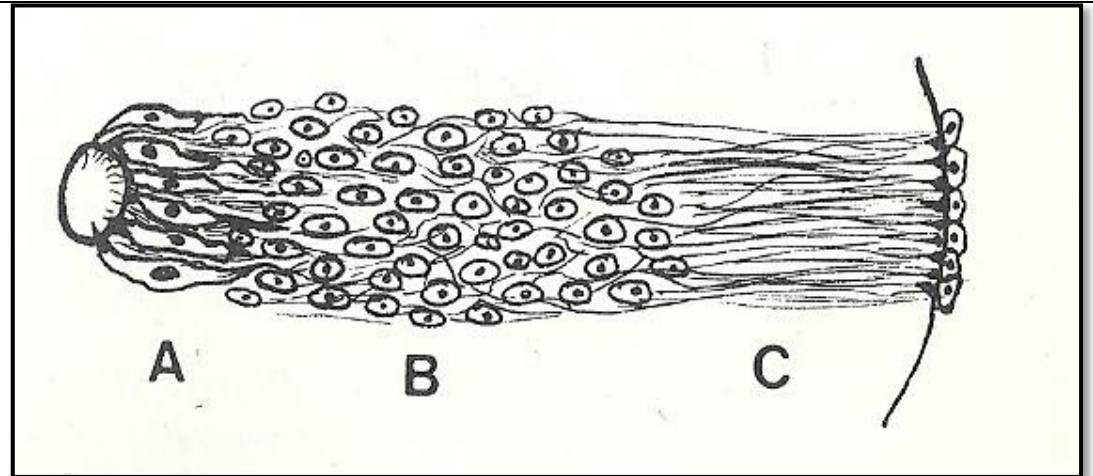


Figura 3: Esquema de la migración del tubo neural en la 5 semana de gestación. A: Capa endimaria en la pared del tubo neural, B: Capa del manto, C: Capa marginal que llega hasta la piamadre en formación. Extraído Vaquero Crespo J.; Fundamentos de la Histología; Primera edición; Madrid; Editorial Importecnica; 157; 1982.

Los neuroblastos se van diferenciando paulatinamente hasta alcanzar la morfología adulta, cambian de forma, se hacen piriformes y pasan por cuatro etapas según Cajal: neuroblasto apolar, etapa que aparecen neurofibrillas gruesas y flexuosas y la argentofilia característica. Etapa de neuroblasto bipolar, inconstante, el armazón neurofibrilar desarrolla dos prolongaciones opuestas polares, una interna, delgada que pronto se reabsorbe y otra externa más gruesa que crece hacia la periferia dentro del mesodermo intraembrionario. Luego continúa la etapa monopolar, cuando pierde la prolongación interna y sigue desarrollándose la externa con un eje neurofibrilar. Se adapta a los intersticios y termina en una arborización rudimentaria.

La etapa final es la del neuroblasto multipolar o neurocito joven, el axón emite colaterales y cuando llega a su destino, comienzan a diferenciarse las

dendritas y aparecen los grumos de Nissl (8, 15). El crecimiento de la expansión axónica se hará posteriormente, mediante el fenómeno de neurotropismo positivo, que consiste en que los tejidos ejercen una atracción sobre el axón (16) (Figura 4).

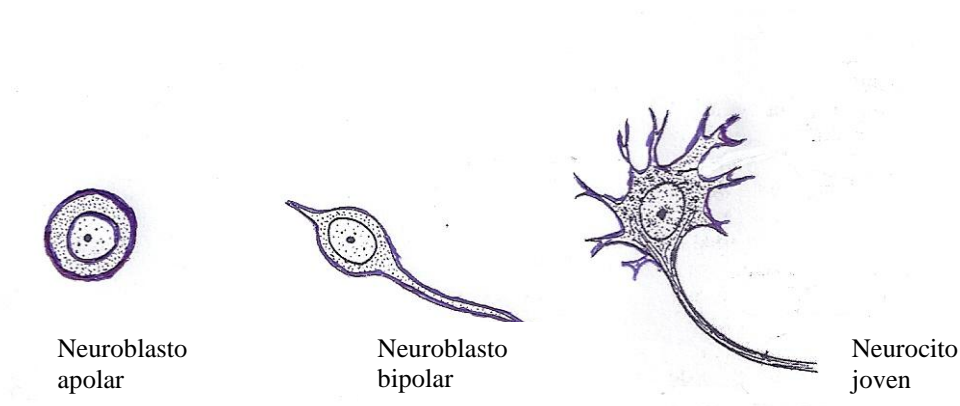


Figura 4: Etapas de desarrollo de un neuroblasto.

Estos estudios fueron confirmados y completados por Cajal quien aportó la descripción de las neuronas y ambos tipos de astrocitos, protoplasmáticos y fibrosos, en diferentes estadios de diferenciación, utilizando técnicas argénticas con el nitrato de plata (8).

Además describió el “tercer elemento” al que calificó de “corpúsculo enano, adendrítico, quizás mesodérmico”.

Finalmente es Del Río Hortega quien con su técnica del carbonato de plata desglosa el “tercer elemento” e identifica dos células: los oligodendrocitos y la microglía (macrófagos), única célula del SNC de origen mesodérmico (17) (Figura 5).

Pío del Río Hortega

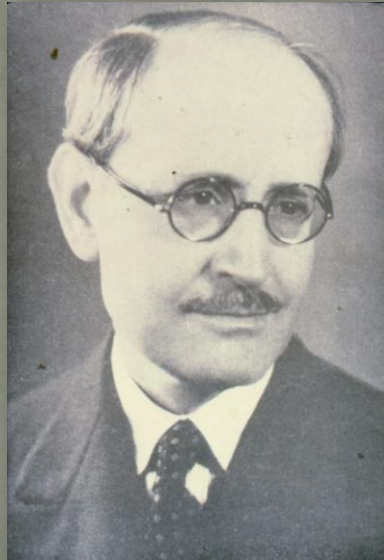


Figura 5: Fotografía de Pío Del Río Hortega.

Cajal dio a conocer su Teoría Neuronal, en la que afirmó que “las neuronas son elementos indiferentes que poseen contacto, pero no continuidad”. Quedó así desterrada la Teoría Reticular de Gerlach quien consideraba que en el tejido nervioso, las fibras nerviosas aferentes y eferentes se anastomosaban y constituían un retículo, es decir que había continuidad entre ellas (9, 21).

I-3 HISTOLOGÍA

El sistema nervioso está formado por intrincadas redes neuronales interconectadas, capaces de captar estímulos del exterior, analizarlos y emitir una respuesta. La unidad de este sistema es la neurona. Además esta compleja red celular que integra el SNC del hombre y de todas las especies de vertebrados está compuesta por una población celular de características bien conocidas desde el punto de vista morfológico y funcional, son las células neurogliales, de la glia o células de soporte. También la microglía.

Clásicamente se ha considerado a las neuronas los elementos más importantes del SNC.

La Neurona

Es la unidad anatómico-funcional del SNC, existiendo una gran variedad de ellas. Se distribuyen ampliamente en el SNC, las zonas donde el número de neuronas predomina respecto al número de prolongaciones axónicas, constituye la sustancia gris, a diferencia de las zonas donde predominan las fibras nerviosas, sustancia blanca. Podemos decir que las neuronas predominan en la sustancia gris del SNC, en los órganos de los sentidos y a nivel de los ganglios del SNP (16).

Cada neurona tiene propiedades que se pueden agrupar en tres grupos: unas con propiedades comunes a todas las células eucariotas, otras específicas de las propias neuronas, y otras típicas del grupo neuronal al cual pertenecen. Presentan gran variabilidad morfológicas indicadora de la diversidad de funciones que realiza.

Las propiedades morfo-funcionales más importantes son dos: polaridad y excitabilidad. También la plasticidad, aunque no es una propiedad específica tiene gran importancia con respecto a la adaptación neuronal a la acción de los agentes externos (23).

Las neuronas tienen un tamaño variable, el cuerpo celular oscila entre 5 y 150 micras y las prolongaciones varían de unas pocas micras de algunas dendritas, a decenas de centímetros en los axones más largos. Las neuronas más pequeñas son los granos del cerebelo y las más grandes las neuronas espinales motoras, las de Purkinge en el cerebelo y las piramidales de la corteza cerebral.

La polaridad está dada por la presencia de dos o más prolongaciones (el axón y la/s dendritas) (24). El axón es el proceso celular a través del cual se transmite el impulso que permite la liberación del neurotransmisor en la sinapsis, es único y de diámetro constante, sin ramificaciones. Las dendritas

son prolongaciones numerosas, altamente ramificadas y más gruesas que el axón, su función es recibir impulsos nerviosos y transmitirlos al cuerpo celular.

La excitabilidad es la base de la comunicación interneuronal. La membrana citoplasmática de la neurona posee abundantes canales iónicos y bombas como la de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, que la hacen altamente excitable y sensible a los cambios de potencial, imprescindible para la recepción, procesamiento y transmisión del estímulo nervioso.

Existe una gran variedad de neuronas clasificándolas según muchos criterios, los más utilizados son los morfológicos, funcionales y topográficos.

Según la morfología y el número de prolongaciones encontramos neuronas multipolares, con múltiples prolongaciones (la gran mayoría, por ejemplo las neuronas piramidales de la corteza), neuronas bipolares, con un solo axón y una sola dendrita (p.e. las neuronas bipolares de la retina) y neuronas pseudomonopolares, que tienen una sola prolongación que se divide en dos (p.e. neuronas sensoriales primarias de los ganglios de las raíces dorsales), éstas neuronas tienen un origen embriológico en forma de neurona bipolar, con dos prolongaciones que se fusionan en su parte más proximal al cuerpo celular, dando lugar a la morfología típica de las neuronas pseudomonopolares (25) (Figuras 6, 7, 8 y 9).

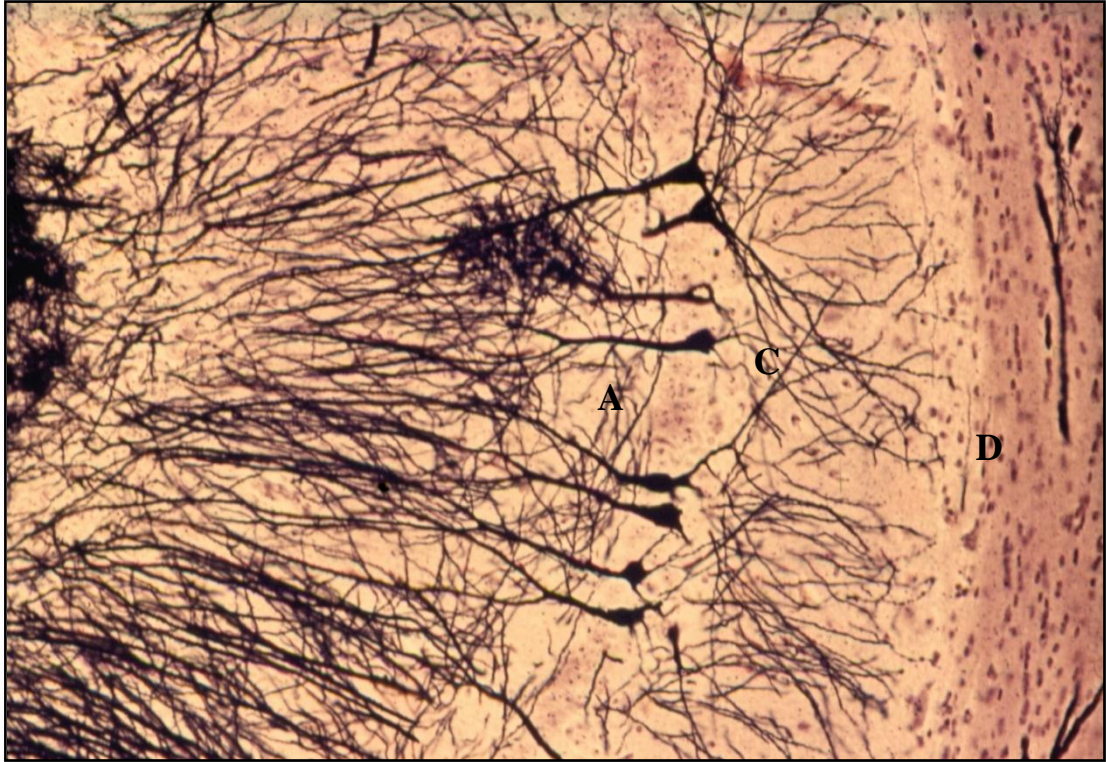


Figura 6: Microfotografía, neuronas normales en corteza cerebral con técnicas de Golgi-Hortega-Laviña, obsérvese D: Dendritas, C: Cuerpo neuronal y A: Axones. 20X.

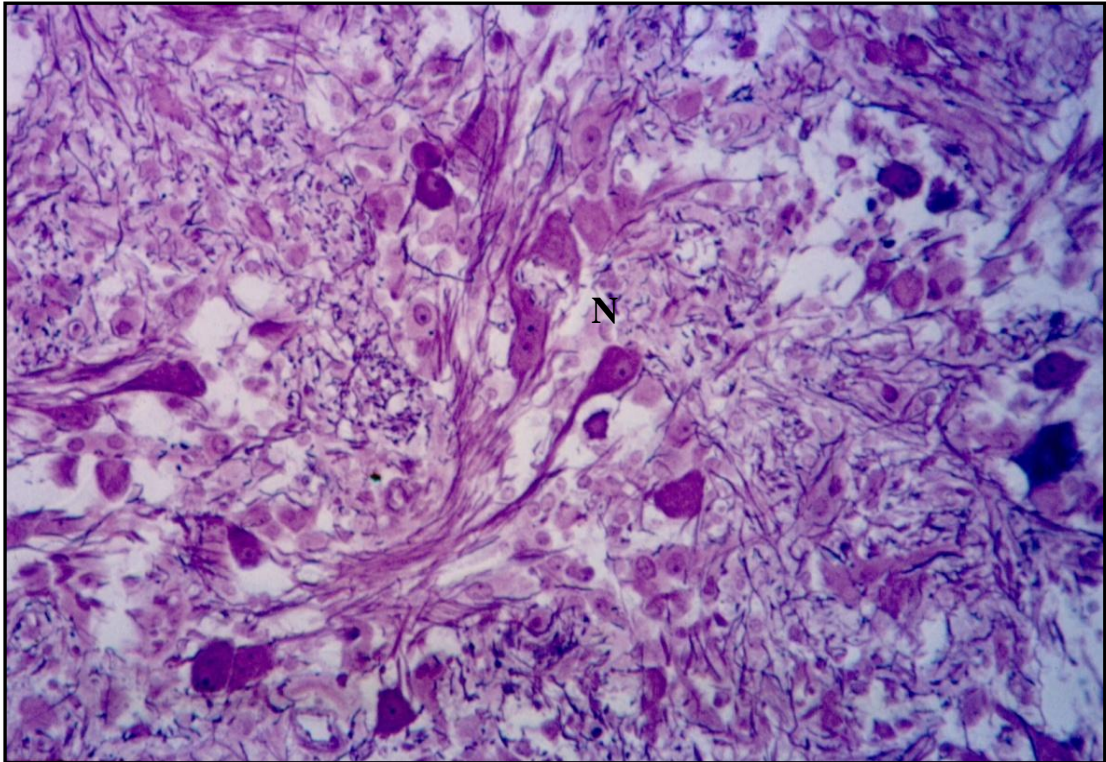


Figura 7: Microfotografía, neuronas normales con técnica de Cajal con sus prolongaciones y axones. N: Neuronas 40X.

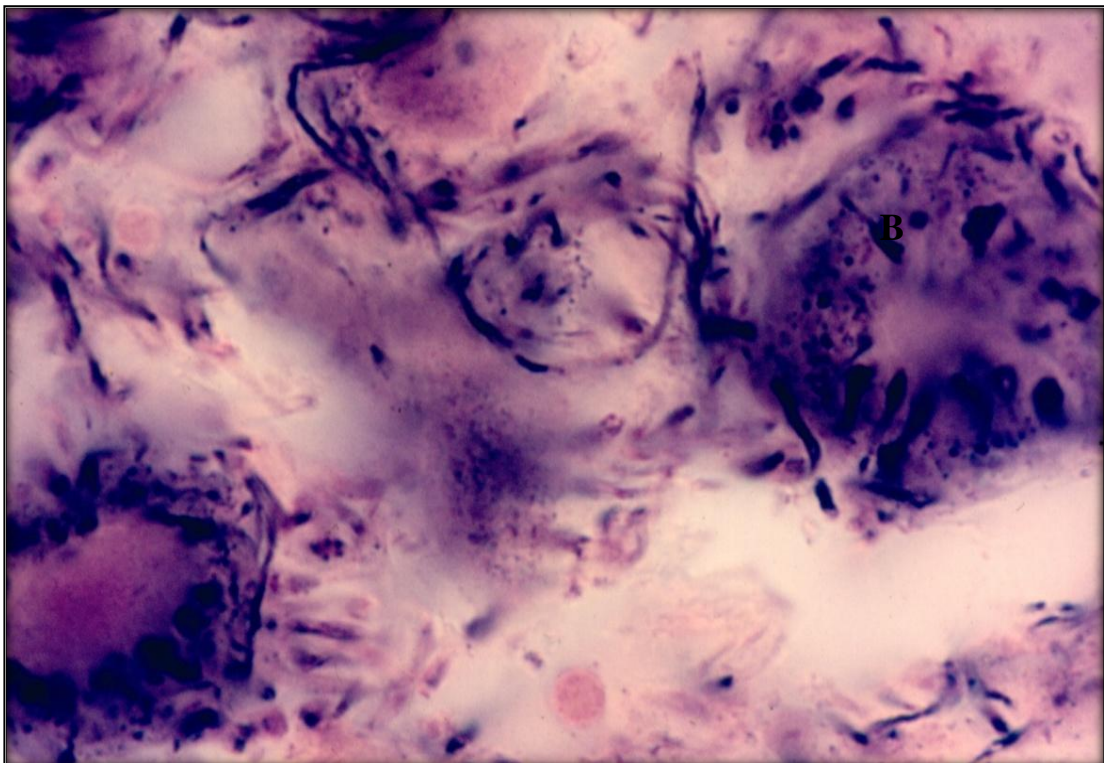


Figura 8: Microfotografía, técnica Del Río Hortega Polak para botones terminales. Obsérvese sinapsis en cuerpos neuronales. B: Botones terminales. 100X.

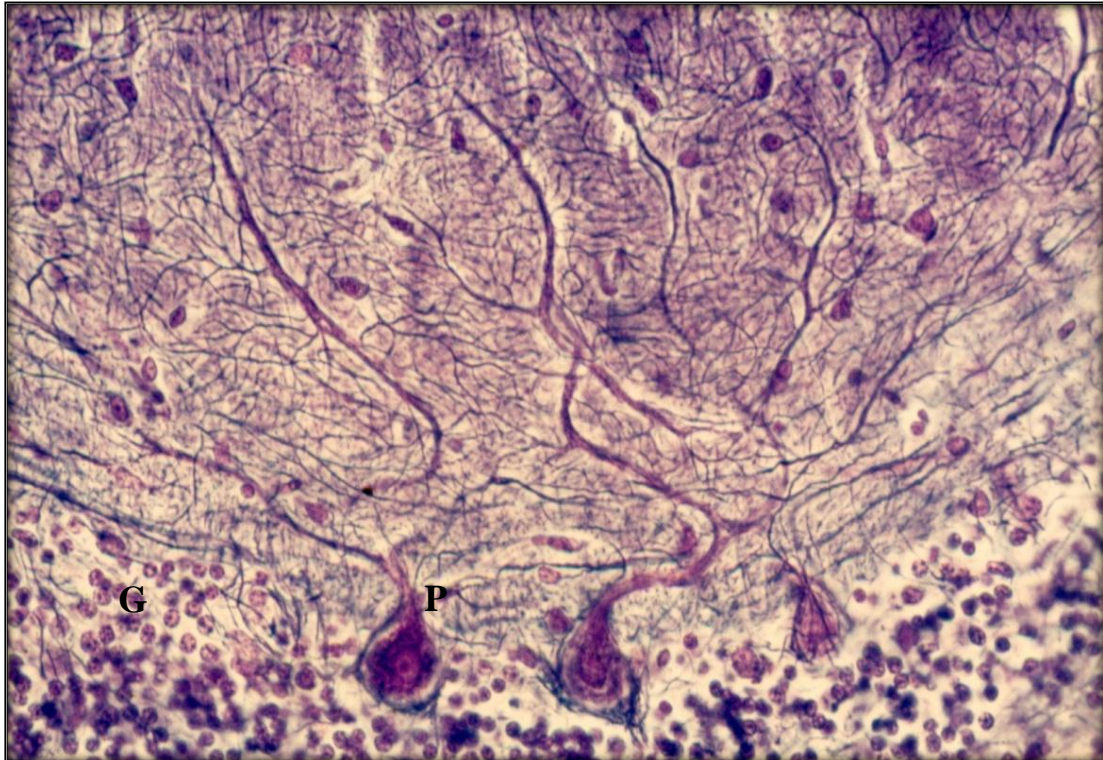


Figura 9: Microfotografía, neuronas del cerebelo, células de Purkinje (P), con típicas arborizaciones, debajo capa de granos (G) con técnica de Cajal. 40X.

Según la función se clasifican en activadoras e inhibidoras.

Otra clasificación las divide en neuronas motoras, sensoriales o interneuronas (24). Según criterios topográficos, podemos diferenciar las neuronas del SNC de las del SNP, o las neuronas de la corteza, las del cerebelo o de la médula, etcétera (etc).

La membrana celular está constituida por una doble capa lipídica con proteínas intercaladas. Las neuronas presentan una gran variedad de proteínas de membrana con múltiples funciones como el reconocimiento celular, la transducción de señales a través de la membrana, la recepción de estímulos y el intercambio de sustancias, entre otras.

Una de las características primordiales de la neurona es la excitabilidad

y la transmisión de los impulsos nerviosos, que se debe a la numerosa presencia de un tipo particular de proteína de transmembrana que son los canales iónicos (26).

Los núcleos neuronales son muy diversos, al igual que las neuronas que presentan gran variabilidad de tamaño, forma y función. La mayor parte de las neuronas presentan núcleos grandes, con tamaños que varían desde 3 a 18 micras. Es esférico u ovoide.

Tiene un único y prominente nucleolo observable en microscopía óptica como una zona basófila y compacta, en el interior del núcleo.

El citoplasma es una zona comprendida entre las dos membranas celulares: nuclear y celular. En ella se extiende un entramado de filamentos de distinto grosor y direcciones, que otorga forma y consistencia a la célula, a la vez que permite el movimiento de las organelas en su interior. Es el citoesqueleto. Bañando esa red de filamentos y a las propias organelas, existe una matriz gelatinosa rica en proteínas, es el citosol, sustrato de la mayor parte de reacciones del metabolismo celular, incluyendo la síntesis de proteínas.

Las organelas se pueden agrupar para su estudio en tres grupos: Las mitocondrias, los peroxisomas y las organelas pertenecientes al sistema membranoso mayor, que incluye además de la dos membranas, al retículo endoplasmático, al aparato de Golgi, los lisosomas y las vesículas de secreción (27, 28, 29, 30, 31, 32, 33).

En las neuronas, por ser células muy activas, es normal que el aparato de Golgi está altamente desarrollado (34, 35). Camilo Golgi (1844-1926) describió por primera vez esta organela en las neuronas.

Las vesículas sinápticas son pequeñas organelas membranosas intracelulares que se acumulan en la terminal pre-sináptica, que también se encuentran en menor cantidad, en el aparato de Golgi (lugar de síntesis), y a lo largo del axón (36). Formando parte de la membrana se han identificado

otras proteínas por ejemplo (p.e.) la dinamina, la mayoría calcio dependientes como la caldesmina, calmodulina y las anexinas. La caldesmina es una proteína de la membrana vesicular, que interacciona con los microfilamentos, la tubulina de los microtúbulos y el ión cálcico. La calmodulina reactiva la movilización. La sinaptofisina proteína de la membrana vesicular, es utilizada como marcador de sinapsis en múltiples estudios (37).

Los neurotransmisores una vez liberados son eliminados de la hendidura sináptica para permitir la propagación de otros estímulos con el menor período refractario. Se han descrito 3 mecanismos de eliminación de sustancias: por difusión, por degradación enzimática y por mediación de moléculas transportadoras.

Las mitocondrias son organelas de origen procariota, que se cree que por simbiosis, se introdujeron primitivamente en la célula eucariota. Las mitocondrias producen la energía (en forma de ATP) y los compuestos con gran poder reductor (p.e. NADH) necesarios para el metabolismo de la neurona.

Las mitocondrias son la única organela de las células animales que poseen ADN propio, con características diferentes al ADN nuclear (38). Es más pequeño que el ADN nuclear (16000 pb), tiene pocos genes y es muy compacto. La distribución de las mitocondrias en las neuronas no es uniforme en toda su superficie (39).

Los peroxisomas son organelas rodeadas por una membrana simple. Los peroxisomas intervienen en un gran número de reacciones oxidativas que utilizan el oxígeno molecular (40, 41).

El citoesqueleto de la neurona es una red tridimensional de microfibrillas constituidas por tres elementos: los microtúbulos, los neurofilamentos y los microfilamentos.

Los microtúbulos son unos filamentos de aproximadamente 25nm de diámetro, formados por ensamblaje de una proteína globular llamada tubulina y otras proteínas denominadas proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Los microtúbulos son los responsables del transporte bidireccional de los orgánulos y de los nuevos componentes, así como del desarrollo y mantenimiento de la polaridad y morfología de la neurona. En el cerebro encontramos diferentes tipos de MAPs: proteínas tau, las MAPs 1 (A y B), 2, 3, 4, 5 (28, 42).

Los neurofilamentos representan el tipo de filamentos intermedios más abundante de las neuronas maduras, con una especificidad por éstas células casi absoluta. Los neurofilamentos forman parte de una familia de filamentos intermedios tipo IV, junto a la nestina, y a la alfa-internexina. Son los filamentos intermedios más gruesos (10nm) y se localizan a lo largo de los axones mielinizados (42).

Mantiene la forma de la neurona, sobre todo del axón, que participaría en su crecimiento radial (en grosor) (43).

Los microfilamentos son polímeros de actina con proteínas reguladoras asociadas. Su estructura es igual a los microfilamentos de las células del organismo.

El axón es una prolongación única, de diámetro constante con pocas o ninguna ramificación, las cuales son monopódicas y forman un ángulo recto con el axón, y se llaman colaterales axónicas. Para su estudio es necesario el uso de tinciones argénticas, que dan una coloración oscura. El axón se inicia en el cono axonal del cuerpo celular y por él se propaga el impulso nervioso captado por las dendritas. En el cono axonal no hay cuerpo de Nissl. En el axón hay neurofilamentos y una red de microtúbulos que se disponen longitudinalmente. Está rodeado por una vaina de mielina, que es un conjunto de capas concéntricas de mielina sintetizada por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP) y por los oligodendrocitos en el sistema nervioso central. Cada oligodendrocito proporciona la vaina de

mielina a más de un axón, a diferencia de las células de Schwann, que cada una rodea a sólo un axón.

La mielina es una sustancia compuesta por un 70% de lípidos (fosfolípidos y colesterol) y un 30% de proteínas (las MAG, Po y PLP, entre otras) (24).

Las dendritas son prolongaciones múltiples que surgen de cualquier zona del cuerpo celular, en variable número y muy ramificadas. Hay una dendrita principal o primaria la cual se ramifica dando lugar a las dendritas secundarias, y éstas a su vez se ramifican dando las dendritas terciarias y así sucesivamente, formando el árbol dendrítico, típico de algunas neuronas (p.e. células de Purkinge). Las dendritas son más cortas y gruesas que los axones y no están rodeadas por vainas de mielina. Su diámetro disminuye al alejarse del cuerpo celular. A diferencia del axón, presenta espinas dendríticas, que son unas cortas ramificaciones en ángulo recto que aumentan el la superficie de contacto y el número de sinapsis.

Para el estudio de las dendritas ha sido de gran importancia las tinciones de impregnación metálica (Golgi, Del Río Hortega, Gogel, Golgi-Cox).

Las dendritas son los lugares de recepción de estímulos por excelencia y tienen una discreta capacidad secretora que les permita modular la información y remoción del neurotransmisor liberado en la sinapsis (44).

TÉCNICAS ARGÉNTICAS PARA EL ESTUDIO DE NEURONAS

Las técnicas utilizadas para neuronas no blastomatosas son: Técnicas argénticas de Golgi-Hortega-Laviña. Técnicas argénticas de Golgi y Cajal con sus variantes (Figuras 10, 11, 12 y 13).

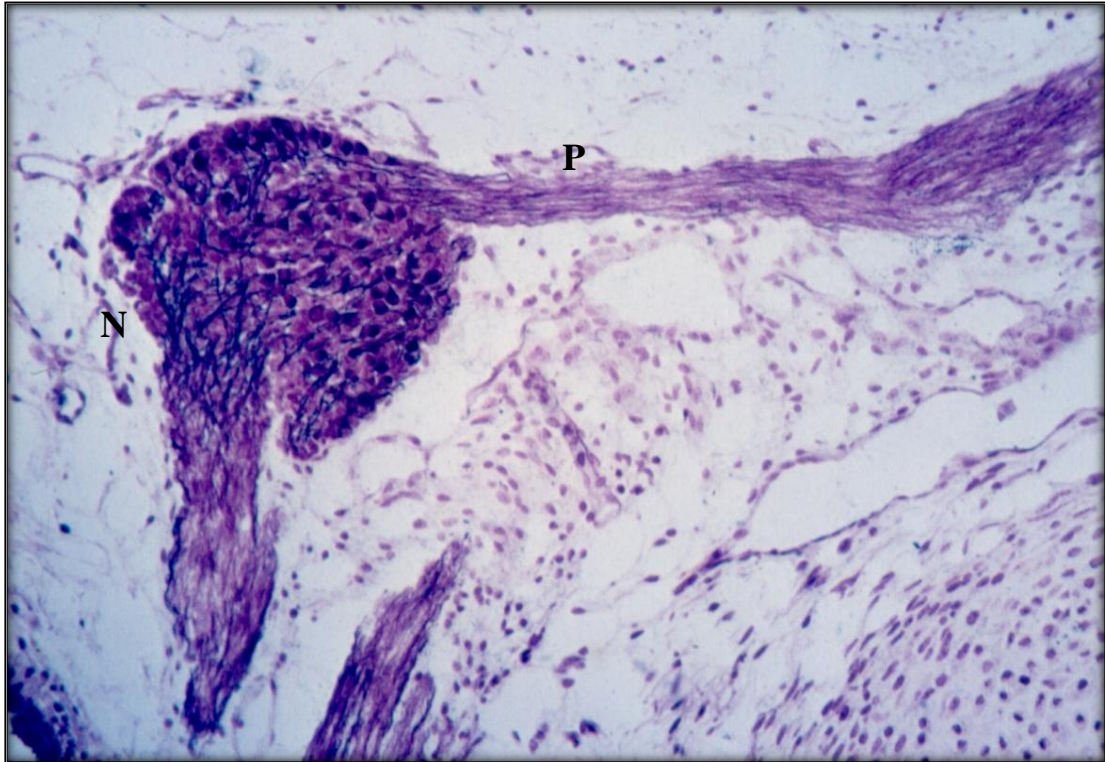


Figura 10: Microfotografía, neuronas (N) en ganglio simpático y sus prolongaciones axónicas (P) distribuidas en el nervio, con técnica de Cajal. 20X.

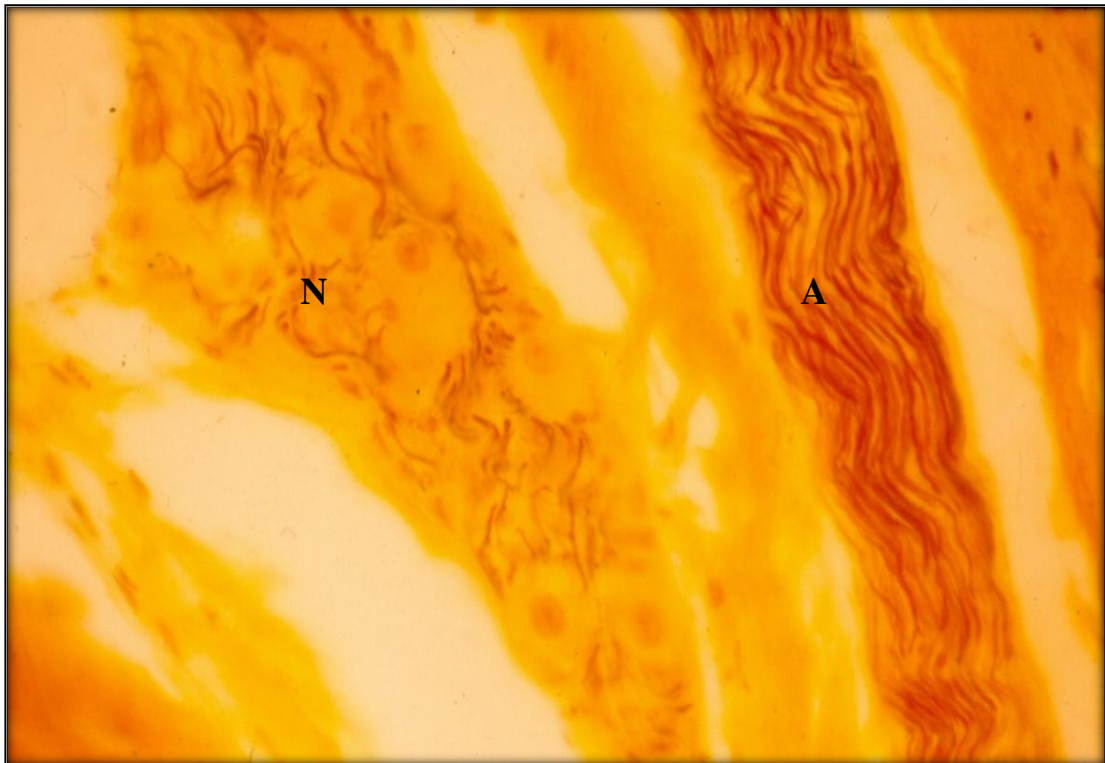


Figura 11: Microfotografía, ganglio simpático con sus neuronas (N) y nervios (Axones) (A). Técnica de Cajal en bloque. 40X.

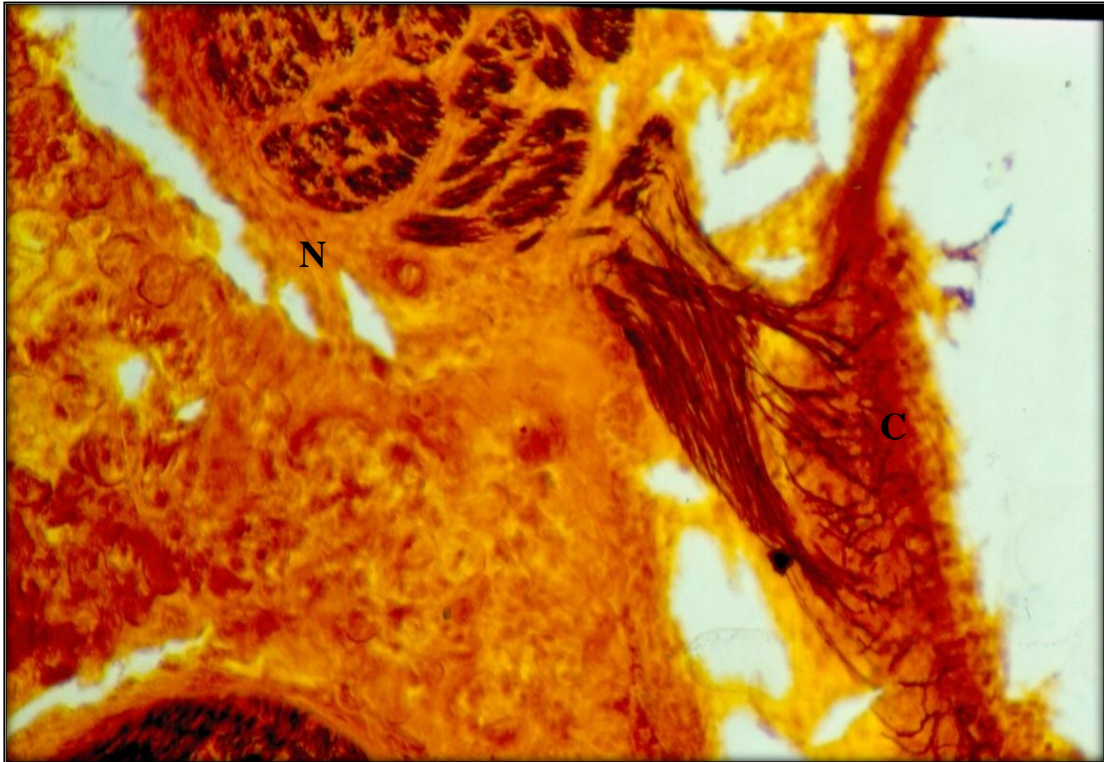


Figura 12: Microfotografía, con técnica de Cajal en bloque, obsérvese el nervio auricular (N) y terminales en el órgano de Corti (C). 40X.

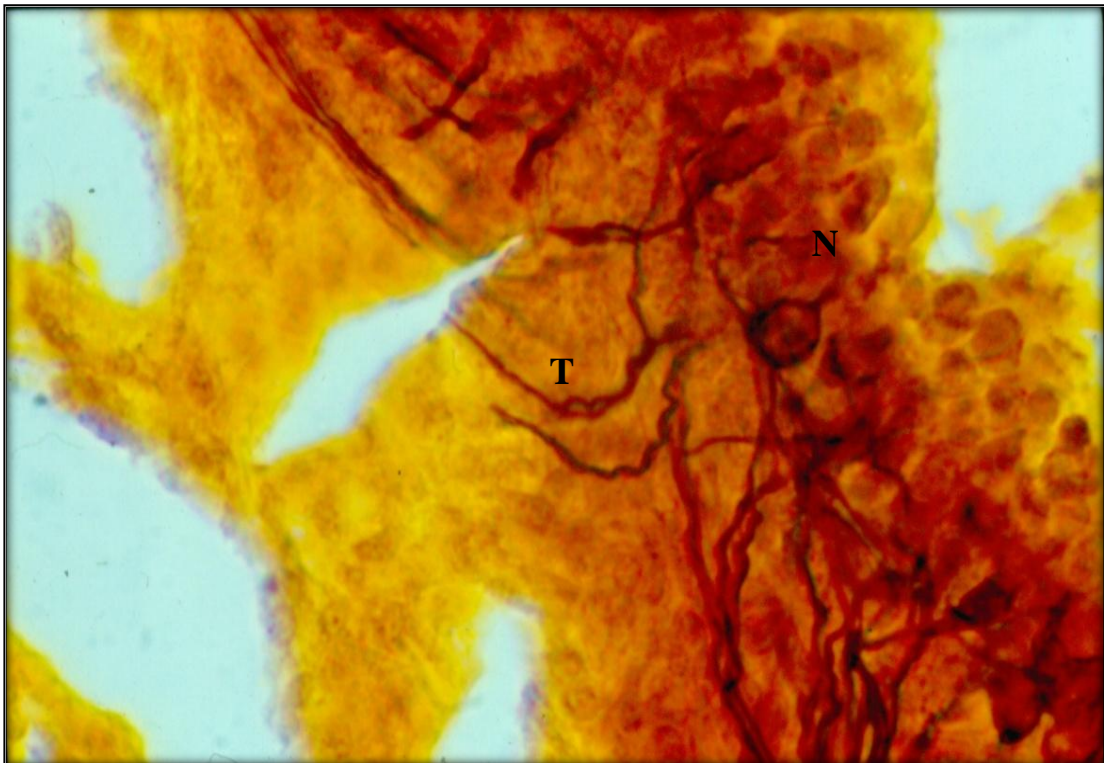


Figura 13: Microfotografía, neuronas (N) del órgano de Corti con técnica de Cajal en bloque, terminaciones nerviosas (T) en el epitelio del órgano de Corti. 100X.

Neuroglía

La glía en el Sistema Nervioso, está representada por elementos celulares, dispuestos entre las neuronas con una función primordial de soporte o sostén, superan en número a las neuronas en una proporción de 10:1 y ocupan el 50% del volumen del SNC. También participan activamente en una variedad de procesos como la regulación de la actividad nerviosa, los fenómenos de plasticidad neuronal y la determinación de la supervivencia de la neuronas (1, 25).

Dentro de la denominación de células de glía consideramos:

- Astroglía
- Oligodendroglía
- Microglía
- Glía ependimaria
- Células gliales del SNP

Astroglía

La astrogliá, macroglía o astrocitos, fueron el primer tipo de célula glial claramente identificado en el parénquima del SNC. Desde los estudios realizados por Cajal y otros, los astrocitos han sido divididos en dos tipos: astrocitos protoplasmáticos y astrocitos fibrosos.

En la segunda mitad del siglo XX, con el advenimiento de la microscopía electrónica, permitió no sólo describir la ultraestructura de los astrocitos , sino también la relación con otros elementos del parénquima nervioso, lo cual llevó a proponer a algunos autores que los astrocitos pudieran estar involucrados en el metabolismo iónico e hídrico (45).

Los astrocitos maduros estudiados con técnicas de impregnación metálica, que tiñen toda la célula, aparecen como células estrelladas muy ramificadas

(Figura 14). Se encuentran distribuidas por todo el SNC, tanto en la sustancia blanca como en la gris, variando su densidad según la región (46).

Los astrocitos fibrosos, como se mostró en las primeras descripciones que usaban métodos de impregnación metálica se localizan preferentemente en la sustancia blanca, y aparecen como células estrelladas con 20-40 prolongaciones que salen del cuerpo celular en todas direcciones, a menudo se alargan hasta alcanzar los vasos sanguíneos, conocido y originalmente descritos por Golgi como “pié chupadores” (47). Actualmente, los astrocitos fibrosos, se pueden identificar mediante la técnica de inmunohistoquímica para la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) y la vimentina, ya que el citoplasma y las prolongaciones están llenas de gliofilamentos. El núcleo es homogéneo con mínima condensación de la cromatina. En el citoplasma encontramos orgánulos, pero lo más destacado son los gliofilamentos, organizados en haces paralelos. El retículo endoplasmático rugoso es escaso, el Golgi poco desarrollado, las mitocondrias alargadas y también se observan lisosomas.

Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran en la sustancia gris y se observan con técnicas de plata como células arborescentes, con numerosas prolongaciones radiales cortas y ramificadas. Cajal describió una variedad de subtipos en función de su localización, forma y prolongaciones. El tipo más común es el astrocito estrellado independiente, con abundantes prolongaciones en todas direcciones, pero sin llegar a contactar con vasos sanguíneos. Los astrocitos protoplasmáticos pueden evidenciarse con inmunohistoquímica para GFAP (48).

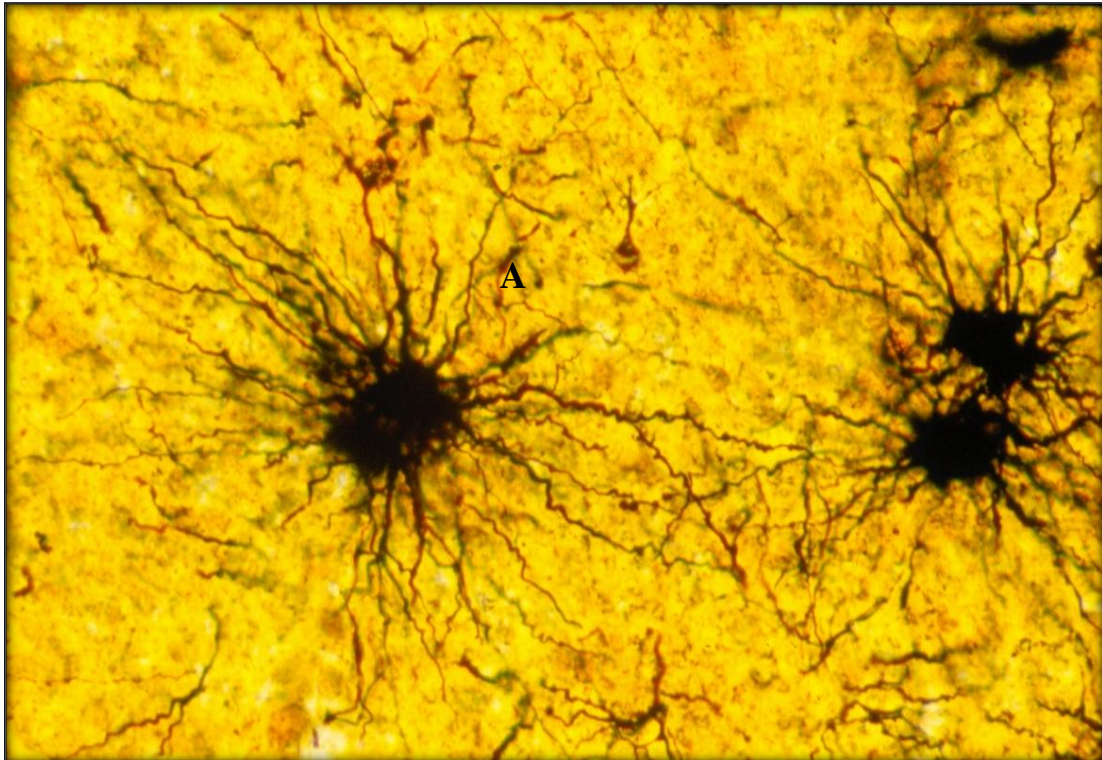


Figura 14: Microfotografía, astrocitos protoplasmáticos (A) observados con técnica de Golgi-Hortega-Laviña. 40X.

La primera descripción de los oligodendrocitos se atribuye a Robertson en 1899 estudiados con técnicas de plata (49). Para Ramón y Cajal constituían el llamado “tercer elemento” de los centros nerviosos y les suponía un origen mesodérmico (47). Fue sin embargo, unos años más tarde cuando Pío del Río Hortega, usando el método del carbonato de plata amoniacal y una modificación de la técnica de Golgi, identificó esas células como un nuevo tipo glial del SNC (50, 51). Del Río Hortega dio el nombre de oligodendroglía (con pocas ramificaciones) y también diferenció los oligodendrocitos de otro tipo celular pequeño, la microglía. Más tarde Del Río Hortega propuso que los oligodendrocitos tenían función mielinizante, suposición que confirmaría en 1958 De Robertis, mediante el empleo del microscopio electrónico.

Cajal en 1909 clasificaba las células gliales en tres categorías: astrocitos protoplasmáticos, astrocitos fibrosos y tercer elemento, siendo a partir de ese tercer elemento de donde Del Río Hortega desglosó la oligodendroglía y la microglía.

El nombre de “microglía” fue propuesto por Del Río Hortega a principios de siglo, para designar a una población de pequeñas células gliales que eran diferentes a los oligodendrocitos y astrocitos utilizando la técnica de carbonato de plata en frío (50, 52, 53). Del Río Hortega se ha basado a su vez, en cuatro conceptos básicos: histogenético, morfológico, fisiológico y fisiopatológico.

En cuanto al concepto histogenético Del Río Hortega en 1930, estableció el origen mesodérmico de la microglía, que proviene de células embrionarias de las leptomeninges y penetran al parénquima nervioso hacia el tercer mes de vida intrauterina, siguiendo el trayecto de los vasos sanguíneos.

Según el concepto morfológico, con la técnica de carbonato de plata en frío, muestra un cuerpo celular pequeño, arriñonado, del que parten dos o más prolongaciones finas y ramificadas. Se localizan más en la sustancia gris que en la blanca, cerca de las neuronas.

En cuanto al concepto fisiológico, la microglía representaría al sistema retículo endotelial en los centros nerviosos.

En cuanto al concepto fisiopatológico, la microglía participaría en forma activa de los procesos inflamatorios y necrotizantes del Sistema Nervioso (SN), adoptando tras adquirir una función macrofágica, diversas formas alargadas o redondeadas (54).

I-4 ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LOS NEUROBLASTOMAS DEL CEREBELO

Los neuroblastomas, llamados meduloblastomas en la clasificación de la WHO, se localizan casi exclusivamente en el cerebelo y retina, pero pueden radicar en otras partes (55). Constituye el tumor maligno cerebelar mas frecuente en los niños con un pico de incidencia entre los 5 y 10 años (56). En los adultos son raros, pero puede ocurrir en la tercera y cuarta década, y el 65% son hombres. En los niños el 75% nace en el vermis cerebelar, a

veces, expandiendo y llenando el cuarto ventrículo. Suelen manifestarse con hidrocefalia obstructiva, con síntomas de dolor de cabeza, vómitos y letargo.

La localización en los hemisferios laterales, aumenta con la edad. Por tomografía axial computada y resonancia magnética, estos tumores son sólidos y se realzan con medio de contraste.

Según su morfología y localización, se los denomina meduloblastomas clásicos, a los que con frecuencia se localizan en el vermis cerebelar y son preferentemente vistos en los niños (3, 10). Macroscópicamente son masas sólidas, friables, gris blanquecinas. Microscópicamente está compuesto por células pequeñas, que se disponen de manera difusa, de núcleos hipercrómicos, de forma redonda o angulada con escaso citoplasma. En la mayor parte de los casos es posible ver, aunque a veces en un área limitada de tejido, disposiciones en rosetas sin luz central (rosetas de Homer-Wright), cuyos núcleos se disponen en forma circular y tienen la cavidad ocupada por procesos citoplasmáticos neurofibrilares (55). En otros casos existen formaciones lobulares más o menos circunscritas por tejido conectivo. El citoplasma de las células neoplásicas se hace visible solamente cuando comienza a diferenciarse, entonces sea en las rosetas o en los elementos dispersos, se esbozan expansiones con características axónicas. La diferenciación se inicia unas veces en el núcleo, y otras por el citoplasma, en el que aparecen neurofibrillas que se condensan en la zona perinuclear, o se extienden por las expansiones celulares. La diferenciación se acompaña de un aumento del volumen celular, pero también las células más pequeñas presentan diferenciación neurofibrilar completa. Con respecto a la forma de los neuroblastos, puede ser redondeada y apolar, lo más frecuente, y monopolar, hasta multipolar, pero en estos casos se trata de neurocitos perfectamente desarrollados. (55).

Los llamados meduloblastomas nodulares (desmoplásicos) por la Organización mundial de la Salud (OMS) tienden a localizarse en los hemisferios cerebelosos y son encontrados en pacientes de mayor edad (adolescentes y adultos). Macroscópicamente son de similares

características al anterior, y microscópicamente tiene disposición micronodular, zonas pálidas de escasa celularidad (islotos pálidos), a menudo esta demarcación en nódulos se debe a su localización próxima a las leptomeninges con participación de fibras colágenas y de reticulina.

La diferenciación neurofibrilar de los neuroblastomas (meduloblastomas en la clasificación de la OMS) se observan con técnicas de plata, inmunohistoquímica y técnicas de biología molecular.

La técnica de plata utilizada para su estudio es la de Doble Impregnación de Del Río Hortega, que impregna de castaño oscuro los procesos citoplasmáticos con diferenciación neurofibrilar.

Las técnicas de Inmunohistoquímica, permiten la detección de antígenos celulares con anticuerpos ligados a la peroxidasa, técnicas de alta sensibilidad y especificidad (10). Hay varios anticuerpos utilizados para células gliales y neuronales, los más difundidos son la GFAP que identifica gliofibrillas, Sinaptofisina (SYN), la proteína neurofilamento, Tubulina isotipo (BIII), proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2C), proteína asociada a microtúbulos 5 (MAP1B), proteína N- Neu, entre otras, para detectar las neurofibrillas (11, 12, 57, 58).

I-5 CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DEL SNC

Comentario histórico de las clasificaciones

Las primeras clasificaciones de tumores primarios del SNC fueron realizadas por Cohnheim ((1889), Ribbert (1918), Bailey y Cushing (1926), Penfield (1931), Bailey (1933) y Del Río Hortega (1932).

La clasificación de Bailey-Cushing en 1926, fue una de las primeras clasificaciones utilizadas, pero la de Bailey en 1933 fue ampliamente difundida.

La clasificación de Del Río Hortega fue publicada en el año 1932 y modificada por Moisés Polak en el año 1966, quien le agregó los tumores de la microglía (2).

La última clasificación de la OMS es del año 2007.

Pío Del Río Hortega fue discípulo de Cajal. Durante la guerra civil española emigró a Oxford y luego fue invitado a dar una conferencia en Argentina, y aquí se radicó hasta su muerte en 1945. Creó un centro de investigación al que concurrieron numerosos médicos, entre los que se destacó Moisés Polak. Hizo investigaciones y publicó trabajos en la Revista “Archivos de Histología Normal y Patológica” editado por Roux-Ocefa. Polak continúa con la metodología de las impregnaciones metálicas, investigando tumores del SNC y SNP, reúne miles de casos en consulta, publica el libro Blastomas del SNC y SNP, agrega los microgliomas a la clasificación de Del Río Hortega y dirige la mencionada publicación hasta su muerte en 1979, concluyendo su pasión por la Patología general, y en especial la neuropatología. Su obra es reconocida mundialmente. Isaac Costero, otro discípulo de Cajal, también emigra hacia Méjico. Todos estos autores conforman la reconocida Escuela Iberoamericana de Patología, desde Cajal hasta Moisés Polak, Costero y sus discípulos (25). A continuación se detallan las distintas clasificaciones a los largo de la historia de los tumores del SNC.

CLASIFICACIÓN DE BAILEY (1933)

- I. Tumores encefálicos
 - a. Gliomas
 1. Glioblastoma multiforme
 2. Espongioblastoma polar
 3. Ependimoma
 4. Neuroepitelioma

5. Astroblatoma
 6. Astrocitoma
 7. Oligodendroglioma
- b. Gliomeuromas
1. Meduloblastoma
 2. Ganglioneuroma
- II. Tumores de las células de cubierta del sistema nervioso
- a. Tumores meningeos
1. Meningotelioma
 2. Fibroblastoma
 3. Osteoma
 4. Lipoma
 5. Melanoblastoma
 6. Hemangioblastoma
 7. Sarcoma
- b. Tumores de las vainas
1. Neurinoma
- III. Tumores hipofisarios
- a. Adenoma
1. Eosinófilo
 2. Cromófobo

b. Craneofaringioma

IV. Disembriomas

1. Quistes teratoides
2. Tumores perlados
3. Cordomas
4. Pinealomas
5. Papilomas

V. Tumores vasculares

1. Hemangioblastoma (tipo Lindau)
2. Angioma racemoso
3. Telangiectasia capilar

CLASIFICACIÓN DE DEL RÍO HORTEGA-POLAK

Clasificación realizada por Del Río Hortega en 1932 y modificada por Polak en 1966 (2).

1) BLASTOMAS DEL PARÉNQUIMA NERVIOSO

a) SECTOR NEURONAL:

- Neuroepitelioma
- Neuroblastoma
- Neurocitoma

b) SECTOR NEUROGLIAL:

- Glioepitelioma
- Glioblastoma: Isomorfo
Heteromorfo
- Astroblastoma: Esferocelular
Longicelular
Con células gigantes
- Astrocitoma: Fibroso
Protoplasmático
- Oligodendroglioma: Esferocelular
Longicelular

c) SECTOR MICROGLIAL

2) BLASTOMAS DE LOS NEUROEPITELIOS

3) BLASTOMAS DE LOS ÓRGANOS ANEXOS AL CEREBRO

4) BLASTOMAS DE HIPÓFISIS Y REGIÓN HIPOFISIARIA

5) BLASTOMAS DE LAS ENVOLTURAS MENÍNGEAS

Clasificación del 2007 de la OMS para los tumores del SNC

TUMOURS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE

Astrocytic tumours

Pilocytic astrocytoma	9421/1 ¹
Pilomyxoid astrocytoma	9425/3*
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Diffuse astrocytoma	9400/3
Fibrillary astrocytoma	9420/3
Gemistocytic astrocytoma	9411/3
Protoplasmic astrocytoma	9410/3
Anaplastic astrocytoma	9401/3
Glioblastoma	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
Gliomatosis cerebri	9381/3

Oligodendroglial tumours

Oligodendroglioma	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma	9451/3

Oligoastrocytic tumours

Oligoastrocytoma	9382/3
Anaplastic oligoastrocytoma	9382/3

Ependymal tumours

Subependymoma	9383/1
Myxopapillary ependymoma	9394/1
Ependymoma	9391/3
Cellular	9391/3
Papillary	9393/3
Clear cell	9391/3
Tanycytic	9391/3
Anaplastic ependymoma	9392/3

Choroid plexus tumours

Choroid plexus papilloma	9390/0
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1*
Choroid plexus carcinoma	9390/3

Other neuroepithelial tumours

Astroblastoma	9430/3
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1
Angiocentric glioma	9431/1*

Neuronal and mixed neuronal-glia tumours

Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioglioma	9412/1
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gangliocytoma	9492/0
Ganglioglioma	9505/1
Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Central neurocytoma	9506/1
Extraventricular neurocytoma	9506/1*
Cerebellar liponeurocytoma	9506/1*
Papillary glioneuronal tumour	9509/1*
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	9509/1*
Paraganglioma	8680/1

Tumours of the pineal region

Pineocytoma	9361/1
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Pineoblastoma	9362/3
Papillary tumour of the pineal region	9395/3*

Embryonal tumours

Medulloblastoma	9470/3
Desmoplastic/nodular medulloblastoma	9471/3
Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3*
Anaplastic medulloblastoma	9474/3*
Large cell medulloblastoma	9474/3
CNS primitive neuroectodermal tumour	9473/3
CNS Neuroblastoma	9500/3
CNS Ganglioneuroblastoma	9490/3
Medulloepithelioma	9501/3
Ependymblastoma	9392/3
Atypical teratoid / rhabdoid tumour	9508/3

TUMOURS OF CRANIAL AND PARASPINAL NERVES

Schwannoma (neurilemoma, neurinoma)	9560/0
Cellular	9560/0
Plexiform	9560/0
Melanotic	9560/0

Neurofibroma	9540/0
Plexiform	9550/0

¹ Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (814A) and the Systematized Nomenclature of Medicine (<http://snomed.org>). Behaviour is coded 0 for benign tumours, 3 for malignant tumours and 1 for borderline or uncertain behaviour.

* The italicised numbers are provisional codes proposed for the 4th edition of ICD-O. While they are expected to be incorporated into the next ICD-O edition, they currently remain subject to change.

Perineurioma	
Perineurioma, NOS	9571/0
Malignant perineurioma	9571/3
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	
Epithelioid MPNST	9540/3
MPNST with mesenchymal differentiation	9540/3
Melanotic MPNST	9540/3
MPNST with glandular differentiation	9540/3

TUMOURS OF THE MENINGES

Tumours of meningotheial cells

Meningioma	9530/0
Meningothelial	9531/0
Fibrous (fibroblastic)	9532/0
Transitional (mixed)	9537/0
Psammomatous	9533/0
Angiomatous	9534/0
Microcystic	9530/0
Secretory	9530/0
Lymphoplasmacyte-rich	9530/0
Metaplastic	9530/0
Chordoid	9538/1
Clear cell	9538/1
Atypical	9539/1
Papillary	9538/3
Rhabdoid	9538/3
Anaplastic (malignant)	9530/3

Mesenchymal tumours

Lipoma	8850/0
Angiolipoma	8861/0
Hibernoma	8880/0
Liposarcoma	8850/3
Solitary fibrous tumour	8815/0
Fibrosarcoma	8810/3
Malignant fibrous histiocytoma	8830/3
Leiomyoma	8890/0
Leiomyosarcoma	8890/3
Rhabdomyoma	8900/0
Rhabdomyosarcoma	8900/3
Chondroma	9220/0
Chondrosarcoma	9220/3
Osteoma	9180/0
Osteosarcoma	9180/3
Osteochondroma	9210/0
Haemangioma	9120/0
Epithelioid haemangioendothelioma	9133/1

Haemangiopericytoma	9150/1
Anaplastic haemangiopericytoma	9150/3
Angiosarcoma	9120/3
Kaposi sarcoma	9140/3
Ewing sarcoma - PNET	9364/3

Primary melanocytic lesions

Diffuse melanocytosis	8728/0
Melanocytoma	8728/1
Malignant melanoma	8720/3
Meningeal melanomatosis	8728/3

Other neoplasms related to the meninges

Haemangioblastoma	9161/1
-------------------	--------

LYMPHOMAS AND HAEMATOPOIETIC NEOPLASMS

Malignant lymphomas	9590/3
Plasmacytoma	9731/3
Granulocytic sarcoma	9930/3

GERM CELL TUMOURS

Germinoma	9064/3
Embryonal carcinoma	9070/3
Yolk sac tumour	9071/3
Choriocarcinoma	9100/3
Teratoma	9080/1
Mature	9080/0
Immature	9080/3
Teratoma with malignant transformation	9084/3
Mixed germ cell tumour	9085/3

TUMOURS OF THE SELLAR REGION

Craniopharyngioma	9350/1
Adamantinomatous	9351/1
Papillary	9352/1
Granular cell tumour	9582/0
Pituicytoma	9432/1*
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	8291/0*

METASTATIC TUMOURS

I-6 OBJETIVOS GENERALES

- Demostrar que los llamados meduloblastomas del SNC son tumores de origen neuronal, con características anatómo-patológicas y morfológicas definidas que le otorgan identidad propia.
- Revalorizar los conceptos de la Escuela Ibero Americana de neuropatología sobre Tumores Neuroblásticos del SNC y su clasificación de acuerdo con Del Río Hortega y Polak.
- Demostrar la validez de la clasificación del Del Río Hortega -Polak.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Las técnicas de impregnación metálicas demostraron la identidad de todas las células del SNC, incluso su embriogénesis, las técnicas argénticas van a demostrar las diferenciaciones neurofibrilares que caracterizan a las neuronas tumorales, y las técnicas moleculares de inmunohistoquímica van a demostrar comparativamente si hay correlación de los resultados. Las técnicas de inmunohistoquímica demuestran la constitución proteica de las células que reaccionan frente a anticuerpos específicos.

- Estudiar comparativamente tumores neuronales del SNC con ambas técnicas, argénticas e inmunohistoquímicas
- Comparar los resultados de éstas técnicas argénticas e inmunohistoquímicas a los fines de demostrar el origen neuronal de los llamados “meduloblastomas”.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

II-1 MATERIALES

Se estudiaron con un diseño retrospectivo tumores neuronales del SNC, de cerebelo, obtenidos de piezas quirúrgicas, provenientes del Hospital Córdoba, Hospital Municipal Infantil, Hospital de Niños y Laboratorio Privado, durante el período 2004-2012.

Los 33 casos estudiados fueron de materiales incluidos en tacos o cassettes de parafina y además 3 de ellos fueron de materiales en fresco, fijados en formol (tabla 1).

Todos los materiales obtenidos fueron de tumorectomías de fosa posterior, cerebelo.

Todos tenían diagnóstico previo de meduloblastoma de cerebelo.

	PROTOCOLO	PROCEDENCIA	EDAD	SEXO	LOCALIZACION
1	620-06	Hosp. Córdoba	23	M	cerebelo
2	13415	Hosp. Córdoba	24	F	cerebelo
3	16073	Hosp. Córdoba	18	M	cerebelo
4	16625	Hosp. Córdoba	21	M	cerebelo
5	C 481	Lab. Privado	7	F	cerebelo
6	13668	Hosp. Infantil	8	F	cerebelo
7	13740	Hosp. Infantil	1	F	cerebelo
8	14623	Hosp. Infantil	9	F	cerebelo
9	14675	Hosp. Infantil	8	F	cerebelo
10	15576	Hosp. Infantil	1	M	cerebelo
11	15833	Hosp. Infantil	4	F	cerebelo
12	17099	Hosp. Infantil	3	F	cerebelo
13	17380	Hosp. Infantil	6	M	cerebelo
14	561-09	Hosp. Niños	9	M	cerebelo
15	601-09	Hosp. Niños	1	F	cerebelo
16	741-09	Hosp. Niños	1	M	cerebelo
17	21831	Hosp. Córdoba	22	F	cerebelo
18	128-04	Hosp. Niños	13	M	cerebelo
19	16483	Hosp. infantil	16	M	cerebelo
20	27945	Hosp. Córdoba	21	M	cerebelo
21	9404	Lab. Privado	20	M	cerebelo
22	13548	Lab. Privado	23	M	cerebelo
23	496-03	Hosp. Niños	13	M	cerebelo
24	1457-06	Hosp. Niños	6	M	cerebelo
25	1299-07	Hosp. Niños	4	F	cerebelo
26	263-08	Hosp. Niños	13	F	cerebelo
27	868-08	Hosp. Niños	6	M	cerebelo
28	313-09	Hosp. Niños	7	F	cerebelo
29	760-04	Hosp. Niños	3	F	cerebelo
30	643-03	Hosp. Niños	3	M	cerebelo
31	1328-02	Hosp. Niños	5	M	cerebelo
32	1243-09	Hosp Niños	6	M	cerebelo
33	1255-09	Hosp. Niños	4	F	cerebelo

Tabla 1- Materiales: procedencia, edad, sexo y localización. Hosp.: Hospital.
Lab.: Laboratorio.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Casos diagnosticados previamente como meduloblastomas-neuroblastomas en los diferentes centros de procedencia del material, de localización cerebelar, corroborados por técnicas de impregnación argéntica e inmunohistoquímica.
- Confirmación diagnóstica histopatológica con dos evaluadores externos.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Se descartaron tumores gliales y metástasis en cerebelo.
- Se descartó material de necropsia.

II-2 MÉTODOS

La fijación del material se realizó en formol al 10%, se incluyó en parafina y la técnica de coloración que se utilizó fue la de H-E. Las técnicas argénticas se realizaron en material incluido en parafina y en material fresco, fijado en formol, realizando cortes por congelación en micrótopo entre 5 a 8 micras.

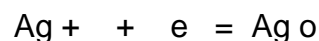
Las técnicas de Inmunohistoquímica se realizaron sobre material incluido en parafina.

II-2.1 FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS DE IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA

Desde el siglo XVIII se conocen técnicas de plata y oro capaces de impregnar sustancias orgánicas, Cajal introdujo técnicas argénticas y áuricas para que el problema del conocimiento de la estructura normal del tejido nervioso avanzara de manera extraordinaria sobre lo conocido hasta entonces, de igual manera el confuso capítulo de la histogénesis e histopatología de las neoformaciones del SN, quedó casi totalmente aclarado cuando Del Río Hortega se dedicó a su estudio empleando las numerosas variantes del método argéntico por él creado. Llegó así analizando principalmente las formas celulares y sus diferenciaciones fibrilares, a edificar una clasificación histogenética que en su extraordinaria sencillez abarca con exactitud a todos los tumores del tejido nervioso (17).

Las células del tejido nervioso poseen numerosas estructuras citoplasmáticas, por lo que se utilizan las técnicas de impregnación argéntica como método para reconocer diferenciaciones estructurales.

Su fundamento es que las sales de plata son reducidas y se depositan sobre las estructuras celulares como plata metálica (Ag⁰). El catión Ag⁺ presente en la solución, es reducido a Ag⁰ con transferencia de electrones desde las estructuras tisulares al catión Ag⁺.



En el momento que la plata es reducida los constituyentes tisulares son oxidados (reacción redox), es decir que es necesario que exista una diferencia de potencial redox de la biomolécula que se quiere demostrar.

La reducción a Ag⁰ la hacen los componentes tisulares y el formol en las reacciones argirófilas.

En la técnica argentafín los tejidos tienen reductores propios y no requieren de reductores exógenos como el formol.

La Ag o reducida por acción del formol da color pardo a negro a las estructuras de las células que fijaron el catión plata.

Los cardinales grupos reductores son las proteínas (aminas libres, purinas, como la adenina y guanina), lipoproteínas (mielina), glicoproteínas, proteoglicanos (condroitín sulfatos y heparina), los filamentos intermedios como la proteína gliofibrilar ácida, los neurofilamentos, queratina, vimentina y desmina.

En las técnicas argénticas para tejido nervioso se usan distintos fijadores y mordientes que modifican el estado físico del tejido al coagular las proteínas y facilitar la permeabilidad y absorción del citoplasma.

Los fijadores son, entre otros, el formol, alcohol, ácido ósmico, piridina, los hipnóticos como el hidrato de cloral y el veronal introducidos por Cajal por su afinidad neurotrópa.

Cada uno le confiere a los constituyentes celulares una particular apetencia por las sales de plata que puede incrementarse agregando un mordiente solo o asociado al fijador.

Los mordientes más usados son la piridina, el bromuro de amonio, el bicromato de potasio, las sales de cromo, el carbonato de sodio o de potasio, o el sulfato de sodio en solución alcohólica, y el formol que es además el fijador para tejido nervioso normal y tumoral y es reductor exógeno.

La piridina actúa como fijador y mordiente y además se combina con la plata naciente liberada por el carbonato argéntico amoniacal de Del Río Hortega y evita la precipitación rápida de la plata sobre los tejidos y la formación de espejo.

La acción del calor a 56^o-60^o C de la lámpara eléctrica o del horno a microondas acelera el depósito de plata soluble, mientras que el frío a temperatura ambiente lo demora 24 a 48 hs.

Por último el hipo o tiosulfato de sodio fija la reacción.

En 1918 Del Río Hortega emplea un nuevo método con el carbonato argéntico que se obtiene combinando el nitrato de plata con el carbonato de litio, de sodio o de potasio, produciendo un precipitado de plata (carbonato

de plata) que es insoluble. Se agrega amoníaco gota a gota hasta formar el carbonato de plata amoniacal y se completa el volumen con agua destilada (59, 60, 2, 60, 17, 63).

II-2.2 TÉCNICAS ARGÉNTICAS

TÉCNICA DE DOBLE IMPREGNACIÓN DE DEL RÍO HORTEGA

Descripción:

- Fijación del material en formol al 10%.
 - 1- Se realizarán cortes por congelación de 5 a 8 micras, pudiendo llegar hasta 15 micras.
 - 2- Se lavará en agua destilada (dos veces).
 - 3- Impregnación en solución de nitrato de plata al 2% con 4-5 gotas de piridina hasta coloración amarillenta (24 horas en frío o 25-40 minutos a 56-60°C).
 - 4- Lavado en agua destilada.
 - 5- Impregnación en el reactivo de Del Río Horteiga con 4-5 gotas de piridina hasta coloración castaño (24 horas en frío o 20-30 minutos a 56-60°C).
 - 6- Algunos cortes se lavarán en agua destilada y se reducirán en formol al 1%, y otros después del lavado en agua destilada, se pasarán a la solución de cloruro de oro al 1:500 (15 minutos en frío o 30 minutos a 56°-60°C)
 - 7- Fijación en hiposulfito de sodio al 5%. Lavado en agua destilada y montaje.
 - 8- Los cortes reducidos en formol también serán montados directamente o previo virado en solución áurica.

INDICACIONES: Para fibras nerviosas y diferenciación neurofibrilar intracitoplasmática, neuroblastomas centrales y periféricos, células argentafines normales y tumorales, melanina normal y tumoral, rabdomioblastos, hongos, canalículos y terminaciones nerviosas (17).

TÉCNICA DE CAJAL-CASTRO PARA TERMINACIONES NERVIOSAS

Se estudia material recién extraído, sin fijar se fragmenta en trozos que no tengan más de 4 mm. de espesor. El tejido muscular debe quedar en solución fisiológica 2 horas.

1- Fijar en :

Alcohol 96°.....25 cc.

Agua destilada.....25 cc.

Piridina 10 cc.

Hidrato de cloral.....5 gr.

Tiempo de fijación: 24 horas.

2- Lavar en agua corriente 24 horas, hasta que desaparezca el olor a piridina.

3- Colocar en alcohol amoniacal (50 cc. de alcohol 96° con 2 gotas de amoníaco).

4- Lavar en agua destilada media hora.

5- Colocar en nitrato de plata al 3 % , en frasco oscuro y en la estufa a 37°C durante 40 días. Agitar suavemente en forma periódica.

6- Lavar en agua destilada 2 horas.

7- Reducir en:

Formol al 15%.....100 cc.

Acido pirogálico o hidroquinona.....1 gr.

Tiempo de este paso: 24 horas.

8- Lavar en agua destilada. Cortar por congelación o incluir previamente en gelatina y luego cortar.

9- Montar en creosota.

Variantes: Si no aparecen detalles nucleares y/o terminaciones o fibras nerviosas, se puede virar en cloruro de oro (1:600) los cortes delgados.

Luego lavar en agua destilada, fijar rápidamente en hiposulfito de sodio al 5 %, lavar y montar.

También se puede contrastar con anilinas.

Esta misma técnica, pero con fijación previa en formol al 10 % se puede utilizar para estudiar células argentafines, corpúsculo carotídeo normal o patológico y el sistema APUD (60).

TÉCNICA DE CAJAL, VARIANTE 1921, PARA NEURONAS, NEUROFIBRILLAS, Y EN ESPECIAL PARA LAS CÉLULAS EN CESTA DEL CEREBELO

- 1- Fijar en formol al 10 % durante un mes.
- 2- Cortar por congelación y lavar en agua destilada.
- 3- Colocar los cortes en una cápsula con nitrato de plata al 1 % y 11 gotas de piridina. Calentar con lámpara hasta color amarillento.
- 4- Trasladar los cortes a una cápsula de Petri con alcohol 96° durante 5 a 10 segundos.
- 5- Reducir, hasta que los cortes tomen color más oscuro en:
Formol al 30 %.....100 cc.
Hidroquinona.....300mg.
- 6- Lavar en agua destilada.
- 7- Fijar en hiposulfito, lavar y montar.

Variantes: El paso 3 puede hacerse en frío, durante 24 hs. Si se desean mostrar botones terminales se dejan en cápsula de nitrato de plata piridinada durante 5 a 7 días, luego se continúa con el paso 4 (60).

TÉCNICA DE DEL RÍO HORTEGA-POLAK PARA MACRÓFAGOS

- Se fijará en formol al 10%.
 - Se realizarán cortes por congelación de 10-15 micrones.
- 1- Lavar en agua destilada.
 - 2- Se colocarán los cortes en una mezcla recién preparada de solución acuosa de carbonato de sodio al 5% más solución acuosa de carbonato de potasio al 5% y alcohol 96% en partes iguales durante 20-30 minutos a 56-60°C. No dejar los cortes más de 30 minutos para evitar la maceración.
 - 3- Se lavarán corte por corte en alcohol 96° durante 2-5 segundos y luego impregnarlos en el reactivo de Del Río Hortega, moviéndolos lentamente durante 15-25 segundos.
 - 4- Se reducirán en formol al 1% agitando los cortes (soplando el líquido reductor o con el asa de vidrio).
 - 5- Se lavarán en agua destilada y montaran previa fijación en solución de hiposulfito de sodio al 5%.
 - 6- VARIANTES: Algunos cortes después de lavados en agua destilada, se pueden virar en cloruro de oro al 1:500 durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego durante 20-30 minutos al calor a 56°-60°C.

Lavar en agua destilada. Fijar en solución de hiposulfito de sodio, nuevamente lavar y montar.

Esta técnica se puede desarrollar en materiales incluidos en parafina. (2)

TÉCNICA DE GOLGI-HORTEGA-LAVIÑA PARA CÉLULAS NERVIOSAS Y NEURÓGLICAS

- 1- Fijación del material inmediatamente de extirpado en la siguiente solución: formol al 10 %, 50 cm, hidrato de cloral 3 gr., bicromato de potasio 3 gr. (agregar al formol el hidratado de cloral, disolver y luego el bicromato de potasio, previamente pulverizado). Los fragmentos del material no deben tener más de 2 a 3 mm de espesor y permanecerán en el líquido fijador durante tres a cinco días, cambiando la solución, que deberá ser preparada en el acto, cada veinticuatro horas. Es importante agitar suavemente varias veces por día el frasco que contiene el fijador con el material.
- 2- Lavar rápidamente en agua destilada en el mismo frasco, luego rápidamente con solución de nitrato de plata al 1 % y dejar a continuación los fragmentos del material en solución de nitrato de plata al 1.75-2 %, durante veinticuatro a cuarenta y ocho horas, preferentemente en la oscuridad.
- 3- Lavar con agua destilada y luego cortar por congelación. Secciones de 15 a 25 micras que se recogen en agua corriente, se lavan rápidamente en agua destilada y se transportan a una cápsula con partes iguales de formol al
- 4- 10 % y carbonato de sodio al 5 %, durante veinte a treinta minutos.
- 5- Lavado en agua destilada y virado en solución de cloruro de oro al 1:500, durante treinta a sesenta minutos (en frío).
- 6- Fijación en solución de hiposulfito de sodio al 10 %, lavado y montaje.

Observaciones: La congelación del material para la obtención de los cortes debe ser poco intensa, para que los mismos no se fragmenten. Conviene colocar en el fijador varios trozos del material en estudio, pasarlos todos juntos a la solución de plata y cortar por congelación cada veinticuatro horas un fragmento, obteniéndose de esta manera resultados que favorecerán la impregnación de las diferentes células nerviosas y neurógllicas (2).

TÉCNICA DE DOBLE IMPREGNACIÓN DE DEL RÍO HORTEGA MODIFICADA

Para materiales procesados e incluidos en parafina se realizan cortes de 10 micras en portaobjetos:

- 1- Se recogen los cortes en cápsula de petri con benzol y/o xilol para desparafinar.
- 2- Dos cambios de alcohol 100 volúmenes de 2 minutos cada uno.
- 3- Un cambio de alcohol 96 volúmenes.
- 4- Un cambio de alcohol 50 volúmenes.
- 5- Llevar los cortes a agua destilada.
- 6- Se agregan 4 gotas de amoníaco durante 4 horas.
- 7- Se lavará en agua destilada (dos veces).
- 8- Impregnación en solución de nitrato de plata al 2% con 4-5 gotas de piridina hasta coloración amarillenta (24 horas en frío o 25-40 minutos a 56-60°C).
- 9- Lavado en agua destilada.
- 10- Impregnación en el reactivo de Del Río Horteiga con 4-5 gotas de piridina hasta coloración castaño (24 horas en frío o 20-30 minutos a 56-60°C).
- 11- Algunos cortes se lavarán en agua destilada y se reducirán en formol al 1%, y otros después del lavado en agua destilada, se pasarán a la solución de cloruro de oro al 1:500 (15 minutos en frío o 30 minutos a 56-60°C).
- 12- Fijación en hiposulfito de sodio al 5%. Lavado en agua destilada y montaje.
- 13- Los cortes reducidos en formol también serán montados directamente o previo virado en solución áurica.

II-2.3 FUNDAMENTO DE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Son procedimientos técnicos muy sensibles basados en el uso de anticuerpos marcados con gran afinidad entre las moléculas de biotina y avidina, que genera un fuerte enlace no inmune.

La avidina es una glicoproteína de alto peso molecular 68000 P.M. que está presente en la clara de huevo y en la bacteria *Streptomyces avidinis* (estreptavidina), ésta posee ventajas sobre la obtenida del huevo, tales como carecer de residuos oligosacáridos y poseer un punto isoeléctrico neutro. En estos casos la molécula está formada por cuatro subunidades, que configuran una tercera estructura con cuatro regiones hidrofóbicas de unión con la biotina, ésta es una vitamina de bajo peso molecular perteneciente al complejo B que se encuentra en la yema del huevo.

La avidina puede combinarse covalentemente con una gran cantidad de proteínas, glicoproteínas, polisacáridos y con el oro coloidal. Es la biotina la que mejor se une a los anticuerpos debido a su pequeño tamaño.

Es posible realizar la marcación con anticuerpos primarios (método directo) o lo que es más común con anticuerpos secundarios (método indirecto).

El método Estreptavidina Biotina Peroxidasa comprende tres pasos (64, 65):

- Incubación con el anticuerpo primario
- Incubación con el anticuerpo biotilado
- Aplicación del complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa

Recuperación Antigénica

La misma tiene por finalidad el desenmascaramiento de aquellos epitopes que han sufrido la acción del formaldehído, solventes orgánicos y ácido nítrico.

Las principales aplicaciones de la inmunomarcación son (66):

- Demostrar la histogénesis de tumores: la persistencia de antígenos de determinado linaje celular en una neoplasia ha demostrado tener gran

impacto en la selección de terapéutica, aumentando la eficacia de tratamientos dirigidos a dichos tumores.

- Permitir la clasificación de tumores: con el fenotipo tumoral, factores que condicionan el abordaje terapéutico.
- Determinación pronóstica de tumores.

II-2.4 TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

MÉTODO DE ESTREPTAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASA

1. Cortes en parafina 3 a 5 micras.
2. Los cortes son estirados en agua tridestilada.
3. Montaje en portaobjetos cargados electropositivamente.
4. Fijación en estufa a 60° C por 4-12hs.
5. Desparafinación en 2 cambios de xilol, 20 minutos cada uno.
6. Dos cambios de etanol 100% de 2 minutos cada uno.
7. Dos cambios de etanol 95% de 2 minutos cada uno.
8. Dos cambios de etanol 90% de 2 minutos cada uno.
9. Dos cambios de etanol 80% de 2 minutos cada uno.
10. Agua destilada 1 minuto.
11. Recuperación antigénica.
12. Lavar con buffer TRIS salino 2 minutos.
13. Agua oxigenada al 3 % en metanol 80%, de 10 a 30 minutos (bloqueo de peroxidasa).
14. Secar e incubar con el primer anticuerpo 1 hora a 37°C.
15. Lavar con buffer TRIS salino 3 a 5 minutos.
16. Secar e incubar con el segundo anticuerpo o anticuerpo biotilado 30 minutos.
17. Lavar con buffer TRIS salino 3 a 5 minutos.
18. Secar e incubar con el complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa 30 minutos.

19. Lavar con buffer TRIS salino 3 a 5 minutos.
20. Revelar. Solución D.A.B. bajo control microscópico 5 minutos.
21. Cortar el revelado sumergiendo los preparados en PBS (TBS).
22. Hematoxilina de Meyer 1 minuto.
23. Virar en agua corriente 5 minutos.
24. Etanol 85% dos cambios de 2 minutos cada uno.
25. Etanol 90% dos cambios de 2 minutos cada uno.
26. Etanol 95% dos cambios de 2 minutos cada uno.
27. Etanol 100% dos cambios de 2 minutos cada uno.
28. Xilol dos cambios de 2 minutos cada uno.
29. Montar los preparados con bálsamo de Canadá.

II-2.5 ANTICUERPOS PARA USO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Syn (Sinaptofisina)

Es una glicoproteína integral de membrana de 38 kD la cual es el mayor componente proteínico integral de membranas de vesículas presinápticas de las neuronas. Como marcador tumoral, ha mostrado su valor en tumores neuronales del SNC y periférico y en tumores neuroendocrinos, con alta especificidad. Visualización citoplasmática (67).

GFAP (Proteína gliofibrilar ácida)

Es una proteína de 51-kD , es el mayor componente de astrocitos, células endoteliales, células de Müller en la retina. Además en células de Schwann, células mioepiteliales y en células de Kupffer Este marcador es útil en distinguir neoplasias de origen astrocítico de otras neoplasias del SNC. Visualización citoplasmática (67).

KI67

El ki67 es una proteína nuclear comprometida en la fase proliferativa del ciclo celular, que está presente en todos los estadios del ciclo celular excepto en G0. Es un marcador de proliferación de poblaciones celulares, es

un marcador pronóstico para tumores del SNC, colon, mama y otros tumores. Visualización nuclear (67).

II-3 INFRAESTRUCTURA

El procesamiento de las técnicas de H-E y argénticas se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Córdoba, en el área del laboratorio de 50 m². El cual presenta mesada de 8 mts de mármol, con baha doble de acero inoxidable, agua caliente y fría. Iluminación con tubos de 1.20 mts fluorescentes luz blanca. Vitrina de vidrio de 2 x 1 mts que contiene diferentes insumos y materiales de uso del laboratorio, heladera, micrótopo manual por rotación, crióstato y micrótopo para congelación.

Escritorio para microscopio de 1.50 x 0.70 mts, microscopio binocular Carl Zeiss con iluminación LED. Banqueta.

El procesamiento de técnicas de inmunohistoquímica se realizó en la Fundación para el Progreso de la Medicina y en laboratorio de anatomía patológica de la Universidad Nacional de La Rioja (UNLAR).

II-4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los parámetros estudiados se analizaron con Chi cuadrado (test de fisher) para la comparación entre las técnicas argénticas e inmunohistoquímicas utilizadas. Para correlacionar la frecuencia de positividad de los tumores en función de las técnicas utilizadas se establecerá un nivel de significación $p < 0.05$ para todos los casos, con test de Chi cuadrado usando software adecuado.

II-5 NOTA

Se resguardarán todos los aspectos, desde el punto de vista ético, relacionados a la confidencialidad de la identidad del paciente, debido a que estos resultados pueden ser utilizados para futuras publicaciones.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

III-1 DESCRIPCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO

De los 33 neuroblastomas correspondientes a pacientes de ambos sexos estudiados, se analizaron los hallazgos macroscópicos y microscópicos, la sintomatología, edad, sexo y localización los cuales se presentaron en forma secuencial y de acuerdo a los diferentes parámetros seleccionados para el diseño estudiado.

En la Tabla 2 figuran los datos de n° de protocolo, procedencia, edad, sexo, localización, técnicas histológicas, argénticas y de inmunohistoquímica realizadas.

	PROTOCOLO	PROCED.	EDAD	SEXO	LOCALIZ.	H-E	ARG	SYN	GFAP	KI67
1	620-06	Hosp.Córdoba	23	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
2	13415	Hosp.Córdoba	24	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
3	16073	Hosp.Córdoba	18	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
4	16625	Hosp.Córdoba	21	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
5	C 481	Hosp.Córdoba	7	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
6	13668	Hosp. Infantil	8	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
7	13740	Hosp. Infantil	1	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
8	14623	Hosp. Infantil	9	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
9	14675	Hosp. Infantil	8	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
10	15576	Hosp. Infantil	1	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
11	15833	Hosp. Infantil	4	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
12	17099	Hosp. Infantil	3	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
13	17380	Hosp. Infantil	6	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
14	561-09	Hosp. Niños	9	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
15	601-09	Hosp. Niños	1	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
16	741-09	Hosp. Niños	1	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
17	21831	Hosp.Córdoba	22	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
18	128-04	Hosp. Niños	13	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
19	16483	Hosp. Infantil	16	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
20	27945	Hosp.Córdoba	21	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
21	9404	Lab. Privado	20	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
22	13548	Lab. Privado	23	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
23	496-03	Hosp. Niños	13	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
24	1457-06	Hosp.Niños	6	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
25	1299-07	Hosp.Niños	4	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
26	263-08	Hosp.Niños	13	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
27	868-08	Hosp.Niños	6	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
28	313-09	Hosp.Niños	7	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
29	760-04	Hosp.Niños	3	F	Cerebelo	X	X	X	X	X
30	643-04	Hosp.Niños	3	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
31	1328-02	Hosp.Niños	5	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
32	1243-09	Hosp.Niños	6	M	Cerebelo	X	X	X	X	X
33	1255-09	Hosp.Niños	4	F	Cerebelo	X	X	X	X	X

Tabla 2: Neuroblastomas. Edad, sexo, localización y técnicas realizadas: SYN: Sinaptofisina. GFAP: Proteína gliofibrilar ácida. H-E: Hematoxilina-eosina. PROCED.: Procedencia. ARG: Tinción argéntica.

En estos pacientes se observó que los neuroblastomas se distribuyeron de acuerdo a la edad de la siguiente manera (Figura 15).

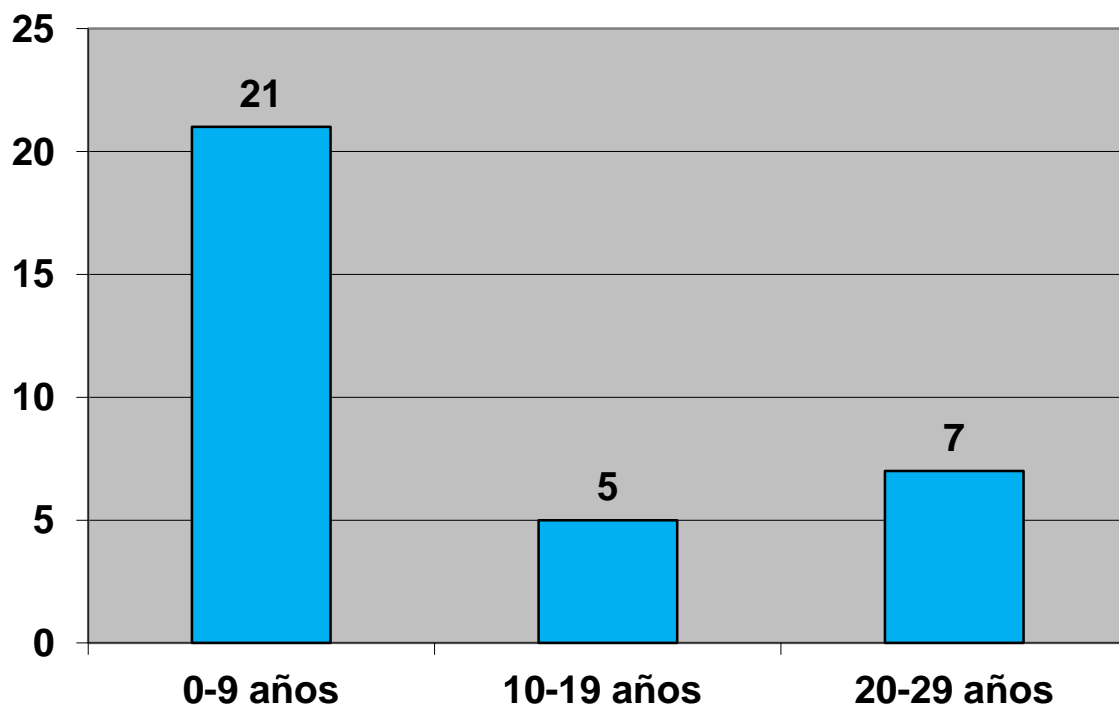


Figura 15: Neuroblastomas. Distribución etaria de los 33 casos estudiados.

La media de la edad fue de 9,97 años con un error estándar (EE) de 1,32 (Tabla 3).

Tabla 3: La media de la edad total (9,97 años) y EE (1,32).

<u>Variable</u>	<u>n</u>	<u>Media</u>	<u>E.E.</u>	<u>Mín</u>	<u>Máx</u>
EDAD	33	9.97	1.32	1.00	24.00

III-2 ESTUDIOS SEGÚN EL GÉNERO Y EDAD EN LOS DIFERENTES GRUPOS ETARIOS

La incidencia en el total de casos estudiados (n 33) es ligeramente mayor en el sexo masculino representando el 55% (n 18), y en el sexo femenino el 45% (n 15) (Figura 16).

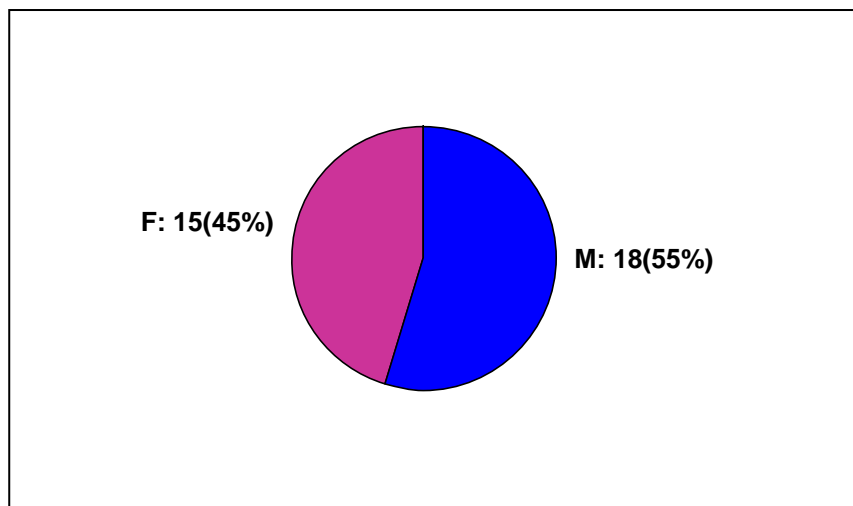


Figura 16: Géneros en el total de casos n 33. F: Femenino. M: Masculino.

La media de la edad fue para las mujeres de 7,87 años, el EE 1,79 y para los hombres de 11,72 años, el EE 1,79 (Tabla 4).

Tabla 4: La media de la edad y EE por género. (Mujeres (F) de 7,87 años, el EE 1,79 y para los hombres (M) de 11,72 años, el EE 1,85).

<u>SEXO</u>	<u>Variable</u>	<u>n</u>	<u>Media</u>	<u>E.E.</u>	<u>Mín</u>	<u>Máx</u>
F	EDAD	15	7.87	1.79	1.00	24.00
M	EDAD	18	11.72	1.85	1.00	23.00

La incidencia del género en el grupo etario de 0 a 9 años se grafica en la Figura 17.

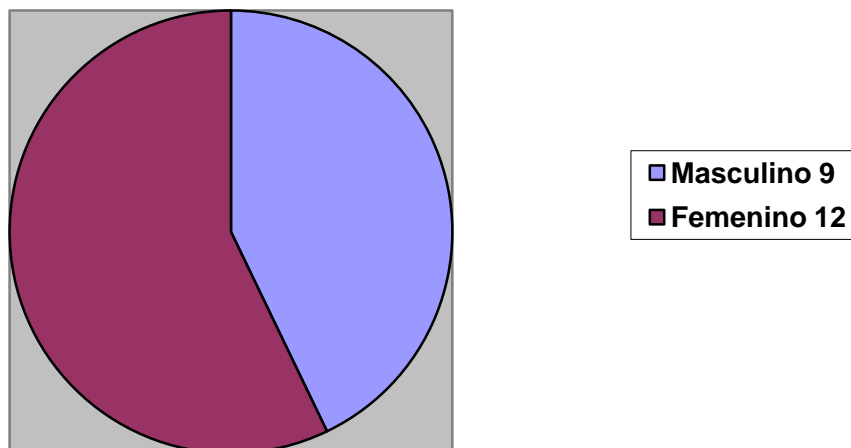


Figura 17: Neuroblastomas. Incidencia según el género en el grupo etario (n 21) de 0 a 9 años.

La incidencia del género en el grupo etario de 10 a 19 años se grafica en la Figura 18.

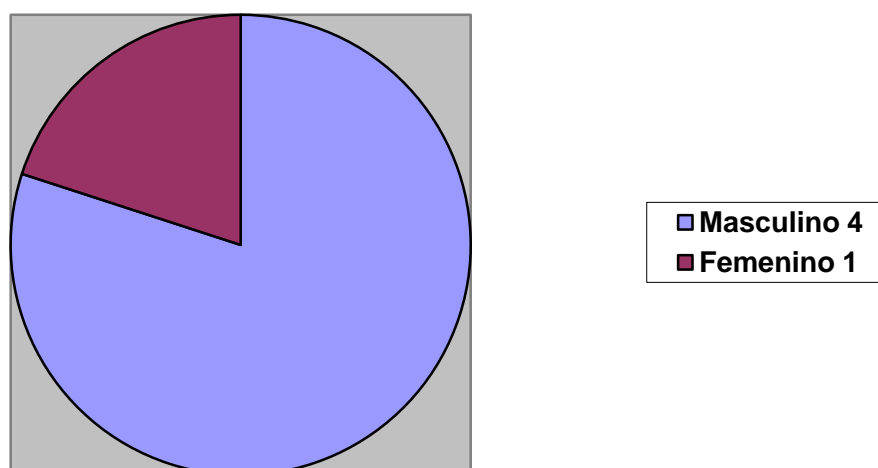


Figura 18: Neuroblastomas. Incidencia según el género en el grupo etario (n 5) de 10 a 19 años.

La incidencia del género en el grupo etario de 20 a 29 años se grafica en la Figura 19.

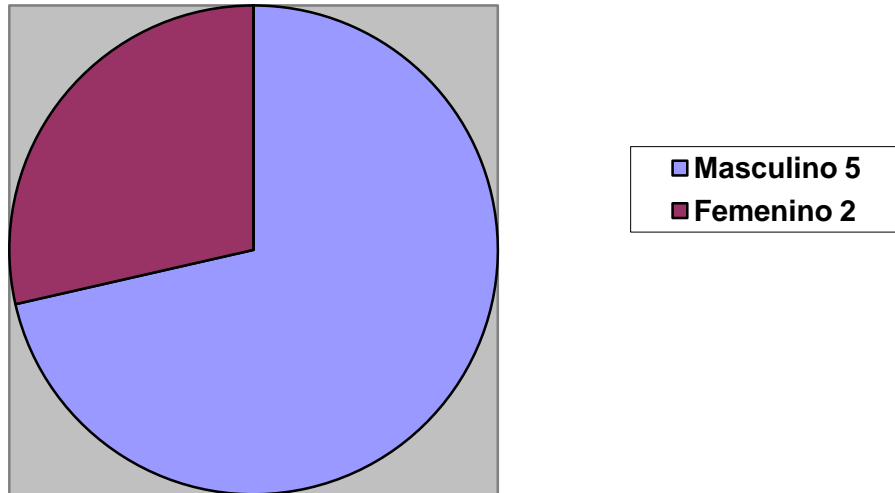


Figura 19: Neuroblastomas. Incidencia según el género en el grupo etario (n 7) de 20 a 29 años.

De acuerdo al grupo etario se observó, que el neuroblastoma predominó entre los 0 a 9 años, en 21 casos con el 63,64% (Tabla 5 y 6).

En cuanto a la frecuencia en relación del grupo etario y sexo, entre los 0 a 9 años (C1) predominó en las mujeres con el 57,14 % (n 12); entre los 10 a 19 años (C2) y los 20 a 29 años (C3) se observó un incremento en la frecuencia en hombres representado el 80% (n 4) y 71,43% (n 5) respectivamente; a diferencia de las mujeres que para los mismos intervalos de edades representaron el 20,00 % (n 1) y 28,57% (n 2) respectivamente (Tabla 7).

Tabla 5: Frecuencia según género y edad categorizada en grupos.

<u>SEXO</u>	<u>C1</u>	<u>C2</u>	<u>C3</u>	<u>Total</u>
F	12	1	2	15
M	9	4	5	18
<u>Total</u>	<u>21</u>	<u>5</u>	<u>7</u>	<u>33</u>

Frecuencias absolutas.

En columnas: CATEDAD: edad categorizada.

C1: 0-9 años, C2: 10-19 años, C3: 20-29 años.

M: masculino F: femenino.

Tabla 6: Frecuencia según género y edad categorizada en grupos.

<u>SEXO</u>	<u>C1</u>	<u>C2</u>	<u>C3</u>	<u>Total</u>
F	80.00	6.67	13.33	100.00
M	50.00	22.22	27.78	100.00
<u>Total</u>	<u>63.64</u>	<u>15.15</u>	<u>21.21</u>	<u>100.00</u>

Frecuencias relativas por filas (expresadas como porcentajes).

En columnas: CATEDAD: edad categorizada.

C1: 0-9 años, C2: 10-19 años, C3: 20-29 años.

M: masculino F: femenino.

Tabla 7: Frecuencia según género y edad categorizada en grupos.

<u>SEXO</u>	<u>C1</u>	<u>C2</u>	<u>C3</u>	<u>Total</u>
F	57.14	20.00	28.57	45.45
M	42.86	80.00	71.43	54.55
<u>Total</u>	<u>100.00</u>	<u>100.00</u>	<u>100.00</u>	<u>100.00</u>

Frecuencias relativas por columnas (expresadas como porcentajes)

En columnas: CATEDAD: edad categorizada.

C1: 0-9 años, C2: 10-19 años, C3: 20-29 años.

M: masculino F: femenino.

Todos los neuroblastomas se localizaron en cerebello (Figura 20).

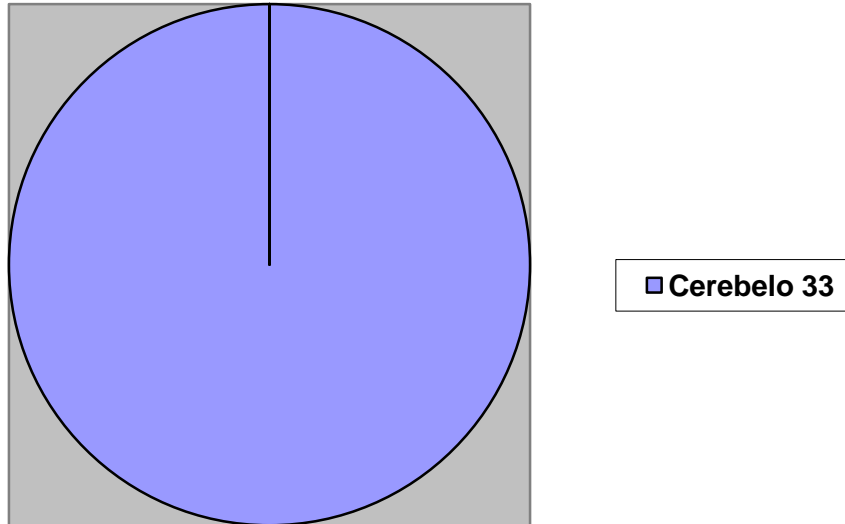


Figura 20: Neuroblastomas. Localización anatómica.

III-3 CLÍNICA Y HALLAZGOS MORFOLÓGICOS

III-3.1 CLÍNICA

La sintomatología motivo de consulta fue variada, cefaleas, mareos, emesis matinal, letargo y en algunos hidrocefalia e hipertensión endocraneana.

III-3.2 MACROSCOPIA

Macroscópicamente de los 33 casos estudiados, 31 se recibieron en múltiples fragmentos fijados en formol al 10%, variando de 6 cm de diámetro mayor a 0.2 cm de diámetro menor.

De los 2 casos restantes se recibieron en un fragmento lobulado, el mayor de 6 cm de diámetro y el menor de 5 cm de diámetro (Figuras 21 y 22).

Todos fueron de color gris-pardo y blanquecino, de consistencia blanda a firme con áreas congestivas.

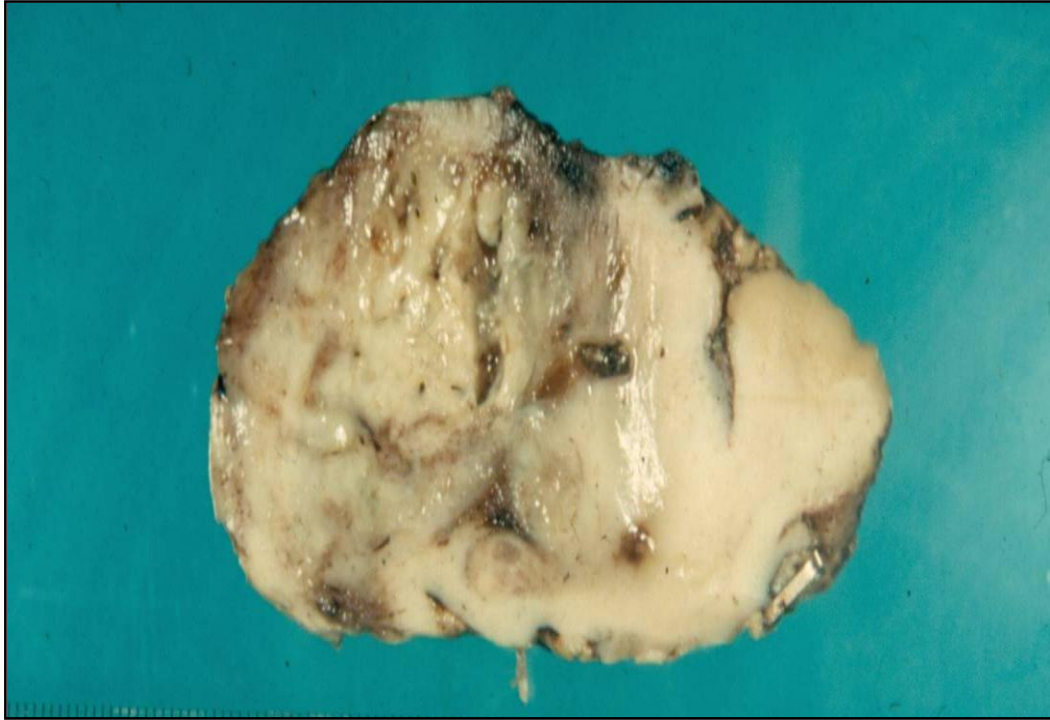


Figura 21: Microscopia del neuroblastoma, tumor pardo blanquecino, con áreas hemorrágicas.

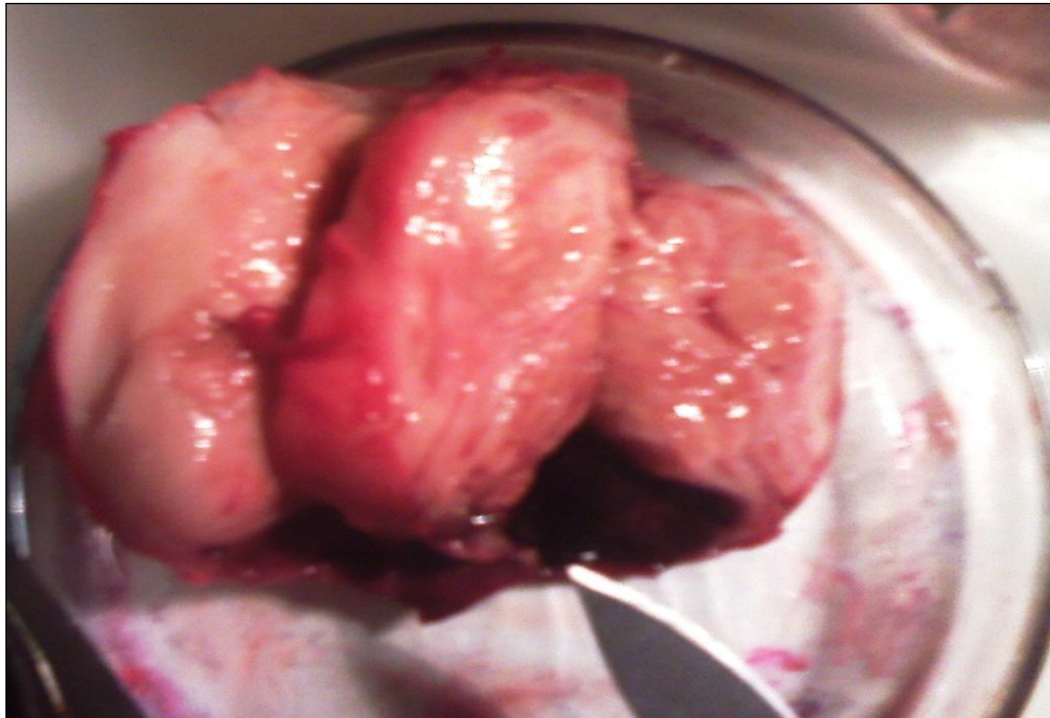


Figura 22: Aspecto macroscópico lobulado del neuroblastoma.

III-3.3 MICROSCOPIA CON HEMATOXILINA EOSINA (H-E)

En el examen microscópico de los 33 tumores estudiados con la técnica habitual de H-E, se observó una neoplasia constituida por células que se disponen de forma difusa o bien en forma de lóbulos circunscriptos por tejido conectivo reticular (Figura 26, 27, 28, 29). Muchas veces las células tienen disposición circular alrededor de espacios sin luz (rosetas) (Figuras 30, 37). En otros sectores forman cordones (figura 35).

Las áreas nodulares se destacaron en 13 casos y la disposición difusa en el resto correspondiente a 20 casos (Tabla 8 y figuras 23, 27, 28 y 32).

Las células neoplásicas eran pequeñas, redondeadas, piriformes, angulosas o poliédricas. Los núcleos eran generalmente más claros a veces con nucléolos prominentes, con actividad mitótica (Figura 27, 31). Las áreas de necrosis tumoral y componente vascular variaron del 3% al 10% en los distintos tumores estudiados (figura 33, 34, 36).

	PROTOCOLO	EDAD	SEXO	LOCALIZACIÓN	NODULAR	DIFUSO
1	620-06	23	M	cerebelo	X	-
2	13415	24	F	cerebelo	X	-
3	16073	18	M	cerebelo	X	-
4	16625	21	M	cerebelo	X	-
5	C 481	7	F	cerebelo	-	X
6	13668	8	F	cerebelo	-	X
7	13740	1	F	cerebelo	-	X
8	14623	9	F	cerebelo	-	X
9	14675	8	F	cerebelo	-	X
10	15576	1	M	cerebelo	-	X
11	15833	4	F	cerebelo	-	X
12	17099	3	F	cerebelo	-	X
13	17380	6	M	cerebelo	-	X
14	561-09	9	M	cerebelo		X
15	601-09	1	F	cerebelo	X	-
16	741-09	1	M	cerebelo	-	X
17	21831	22	F	cerebelo	X	-
18	128-04	13	M	cerebelo	X	-
19	16483	16	M	cerebelo	X	-
20	27945	21	M	cerebelo	X	-
21	9404	20	M	cerebelo	X	-
22	13548	23	M	cerebelo	X	-
23	496-03	13	M	cerebelo	X	-
24	1457-06	6	M	cerebelo	-	X
25	1299-07	4	F	cerebelo	X	-
26	263-08	13	F	cerebelo	-	X
27	868-08	6	M	cerebelo	-	X
28	313-09	7	F	cerebelo	-	X
29	760-04	3	F	cerebelo	-	X
30	643-03	3	M	cerebelo	-	X
31	1328-02	5	M	cerebelo	-	X
32	1243-09	6	M	cerebelo	-	X
33	1255-09	4	F	cerebelo	-	X

Tabla 8: Neuroblastomas con disposición en áreas nodulares y difusas.

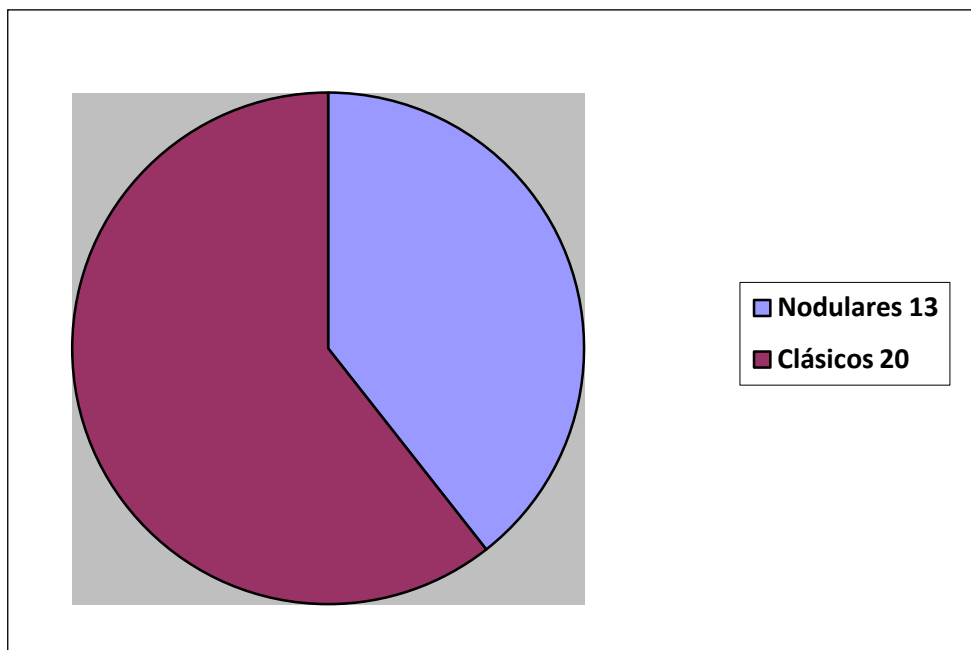


Figura 23: Variantes morfológicas de los neuroblastomas nodulares/desmoplásicos y clásicos/difusos.

La distribución por edad y variantes morfológicas nodulares y difusas se grafican en Figuras 24 y 25.

La relación entre el sexo, la edad de presentación y el patrón histológico, mostró de manera significativa ($p < 0.0001$) que, en las mujeres predominó el patrón difuso con el 33,33% (n 11) y el 90,91% de las mismas pertenecieron al grupo etario de entre 0 a 9 años (n 10) (Tabla 9, 10 y 11). En los hombres no hubo un patrón predominante. Sin embargo se observó en relación a la edad, que entre los 0 a 9 años (C1) el patrón predominante fue el difuso 100% (n 9) y entre los 10 a 19 años (C2) y 20 a 29 años (C3) predominó el patrón nodular, con el 44,44% (n 4) y 55,56% (n 5) respectivamente (Tabla 11).

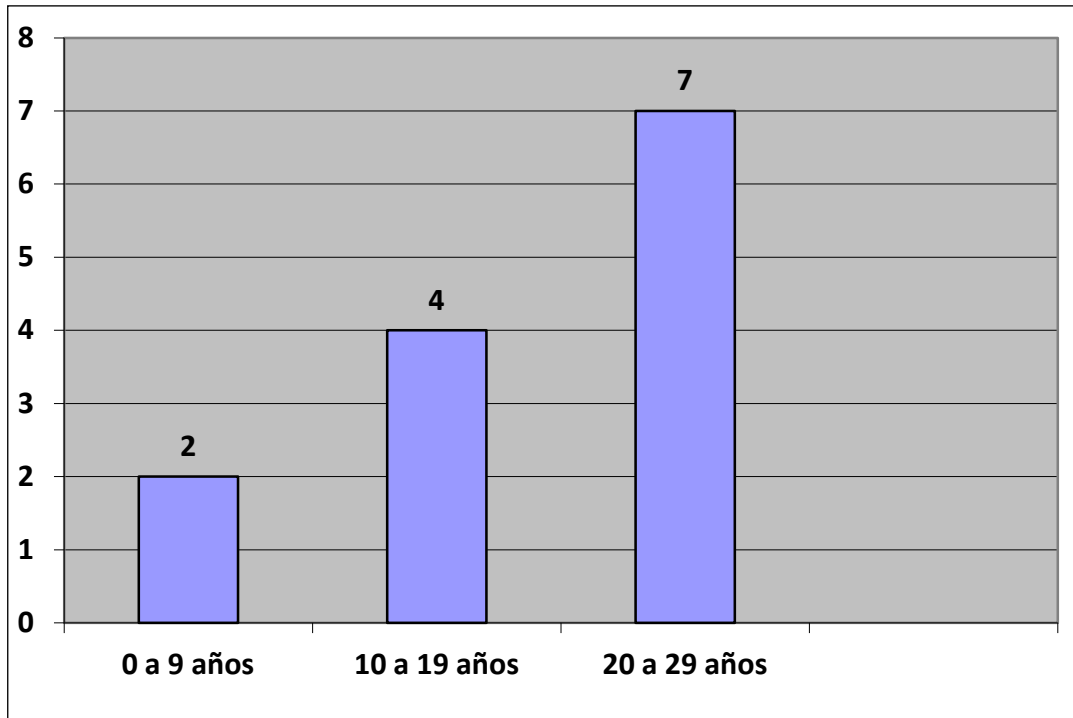


Figura 24: Distribución por edad de los neuroblastomas nodulares/desmoplásicos.

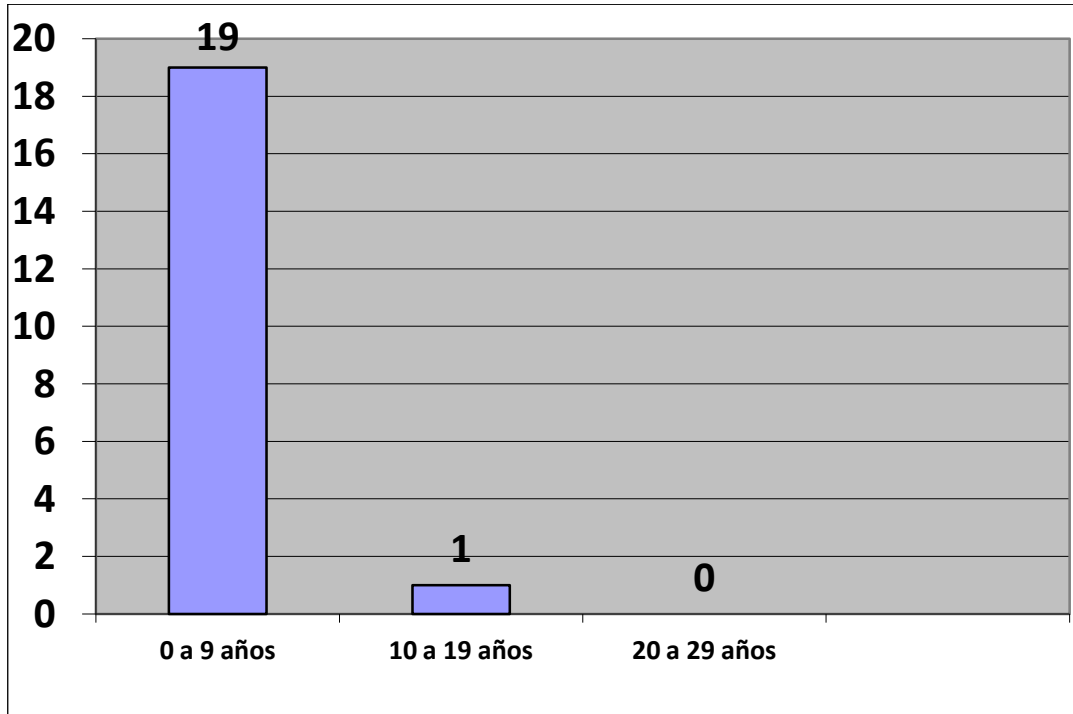


Figura 25: Distribución por edad de los neuroblastomas clásicos.

Tabla 9: Frecuencia del patrón histológico en relación a la edad y género.

<u>CATEDAD</u>	<u>1:F</u>	<u>1:M</u>	<u>2:F</u>	<u>2:M</u>	<u>Total</u>
C1	2	0	10	9	21
C2	0	4	1	0	5
C3	2	5	0	0	7
<u>Total</u>	<u>4</u>	<u>9</u>	<u>11</u>	<u>9</u>	<u>33</u>

Frecuencias absolutas.

En columnas: patrón histológico: sexo.

Patrón Histológico: 1: nodular, 2: difuso.

Sexo: M: masculino F: femenino.

CATEDAD: edad categorizada.

C1: 0-9 años, C2: 10-19 años, C3: 20-29 años.

Tabla 10: Frecuencia del patrón histológico en relación a la edad y género.

<u>CATEDAD</u>	<u>1:F</u>	<u>1:M</u>	<u>2:F</u>	<u>2:M</u>	<u>Total</u>
C1	9.52	0.00	47.62	42.86	100.00
C2	0.00	80.00	20.00	0.00	100.00
C3	28.57	71.43	0.00	0.00	100.00
<u>Total</u>	<u>12.12</u>	<u>27.27</u>	<u>33.33</u>	<u>27.27</u>	<u>100.00</u>

Frecuencias relativas por filas (expresadas como porcentajes).

En columnas: patrón histológico: sexo.

Patrón Histológico: 1: nodular, 2: difuso.

Sexo: M: masculino F: femenino.

CATEDAD: edad categorizada. C1: 0-9 años, C2: 10-19 años, C3: 20-29 años.

Tabla 11: Frecuencia del patrón histológico en relación a la edad y género.

<u>CATEDAD</u>	<u>1:F</u>	<u>1:M</u>	<u>2:F</u>	<u>2:M</u>	<u>Total</u>
C1	50.00	0.00	90.91	100.00	63.64
C2	0.00	44.44	9.09	0.00	15.15
C3	50.00	55.56	0.00	0.00	21.21
<u>Total</u>	<u>100.00</u>	<u>100.00</u>	<u>100.00</u>	<u>100.00</u>	<u>100.00</u>

Frecuencias relativas por columnas (expresadas como porcentajes).

En columnas: patrón histológico: sexo.

Patrón Histológico: 1: nodular, 2: difuso.

Sexo: M: masculino F: femenino.

CATEDAD: edad categorizada. C1: 0-9 años, C2: 10-19 años, C3: 20-29 años.

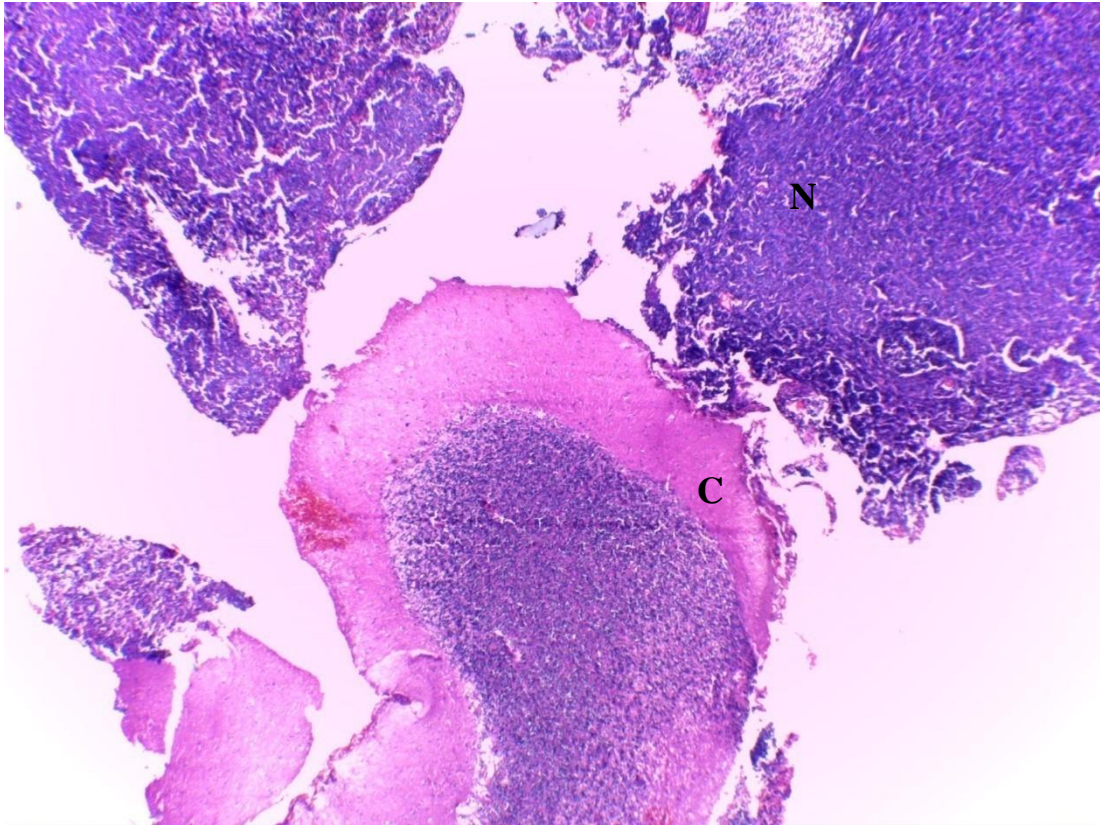


Figura 26: Microfotografía, neuroblastoma (N) con áreas difusas y cerebelo (C) normal. H-E 4X.

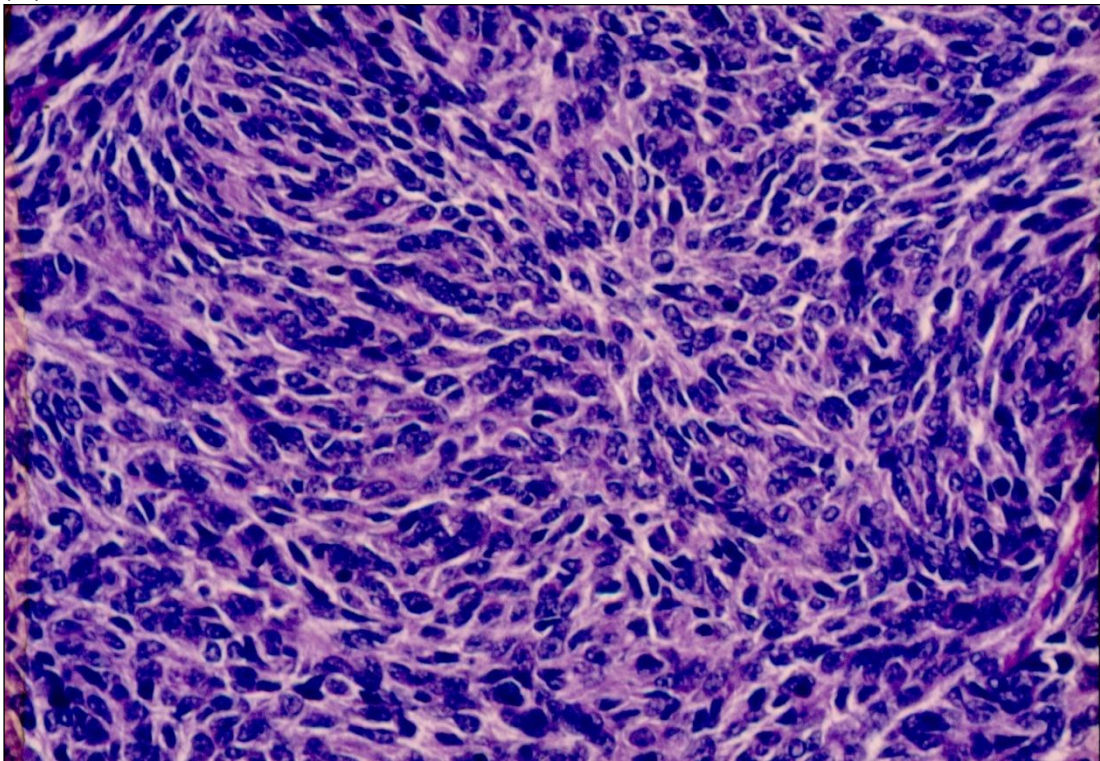


Figura 27: Microfotografía, neuroblastoma, células de disposición difusa, núcleos hipercrómicos con anisocariosis y escaso citoplasma. H-E 40X.

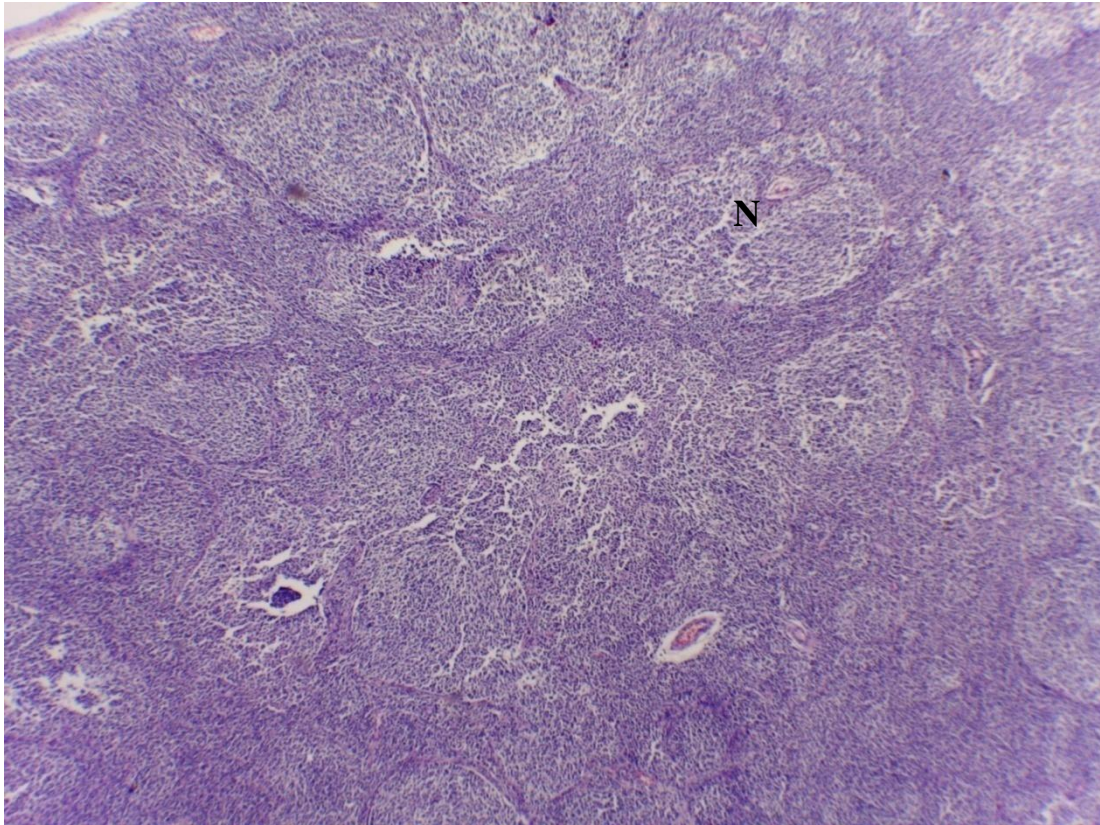


Figura 28: Microfotografía, neuroblastoma en un área claramente nodular (N) rodeada por tejido fusocelular y sectores con desmoplasia. H-E 10X.

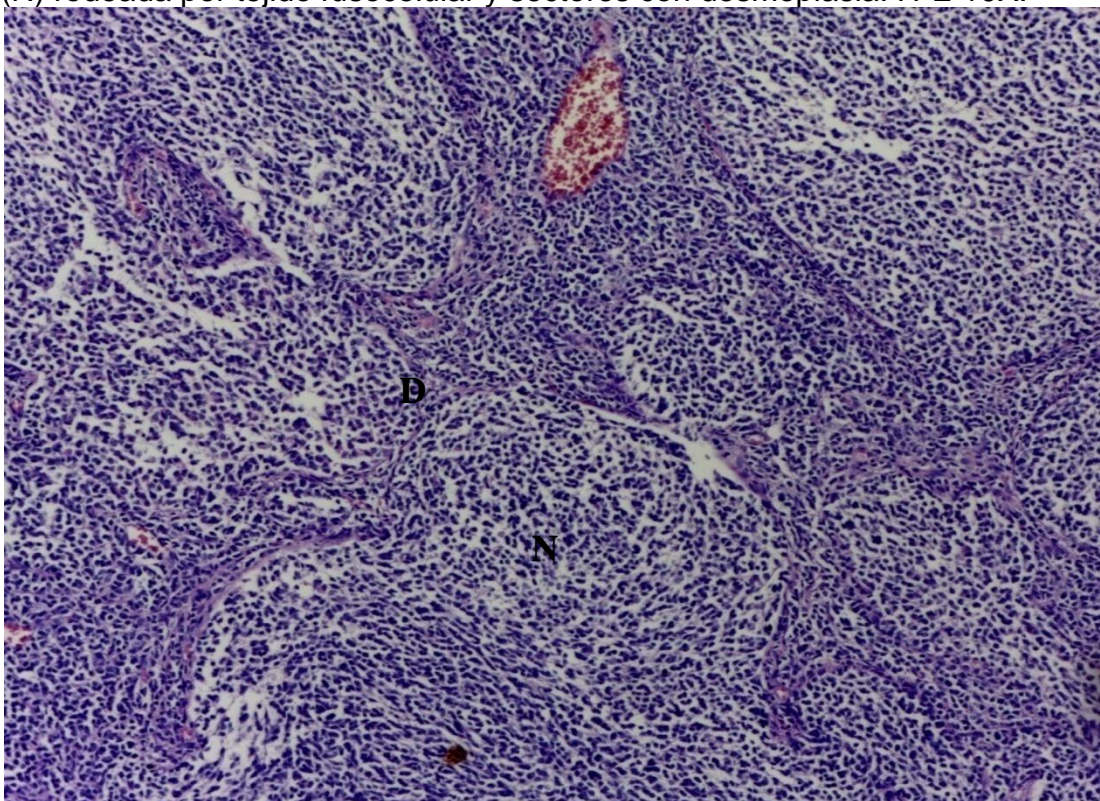


Figura 29: Microfotografía, neuroblastoma en área nodular (N) rodeada por zona desmoplásica (D). H-E 10X.

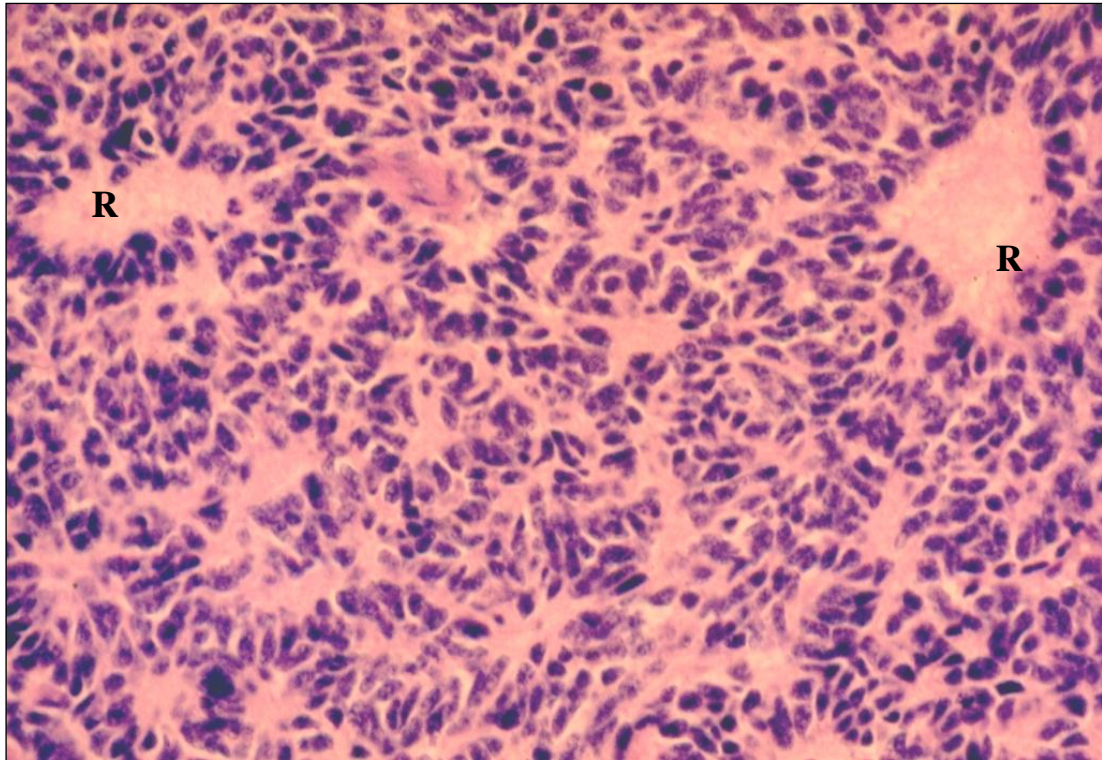


Figura 30: Microfotografía, neuroblastoma, distribución distintiva de rosetas (R) sin luz. H-E 10X.

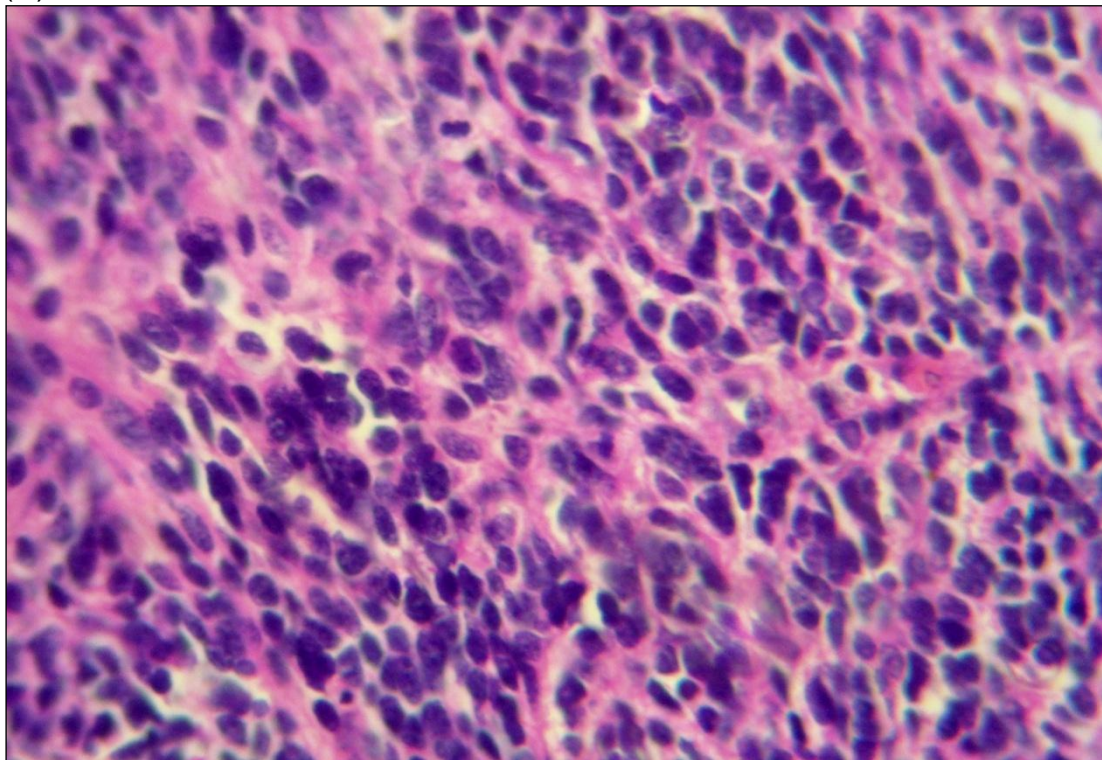


Figura 31: Microfotografía, neuroblastoma a mayor aumento se observan células atípicas, pequeñas, de núcleos hiperocrómicos. H-E 40X.

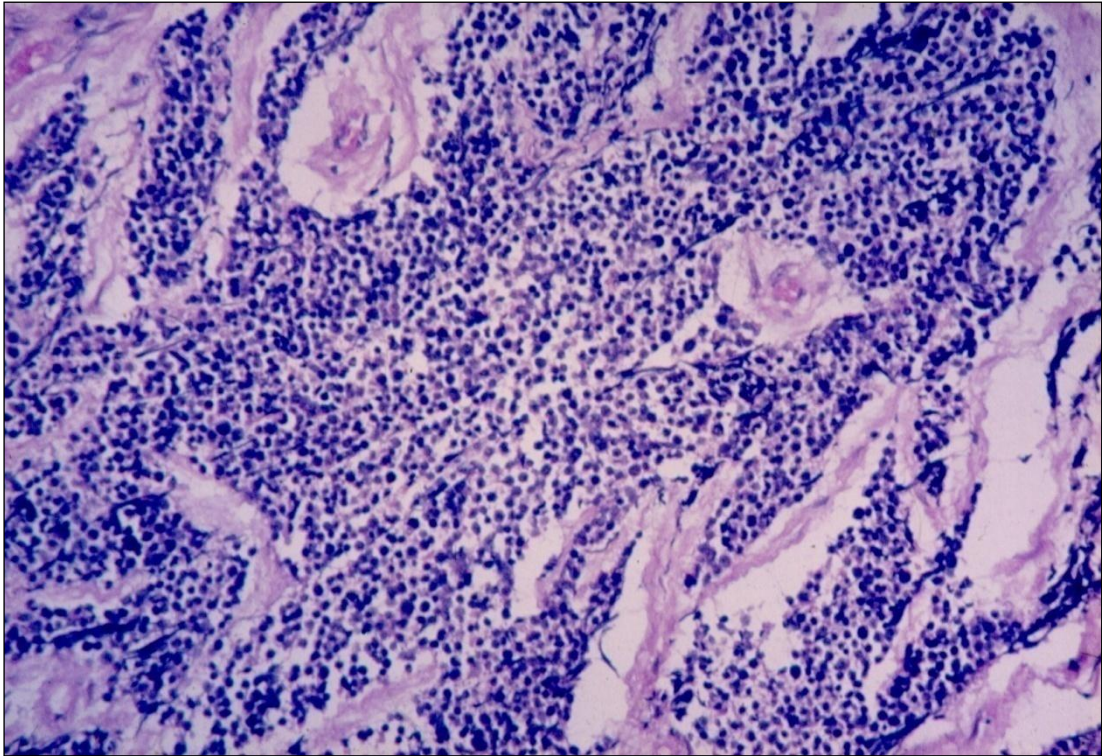


Figura 32: Microfotografía, neuroblastoma en zona con mayor de densidad celular. Los núcleos son pequeños, hipercrómicos y con escaso citoplasma. H-E 10X.

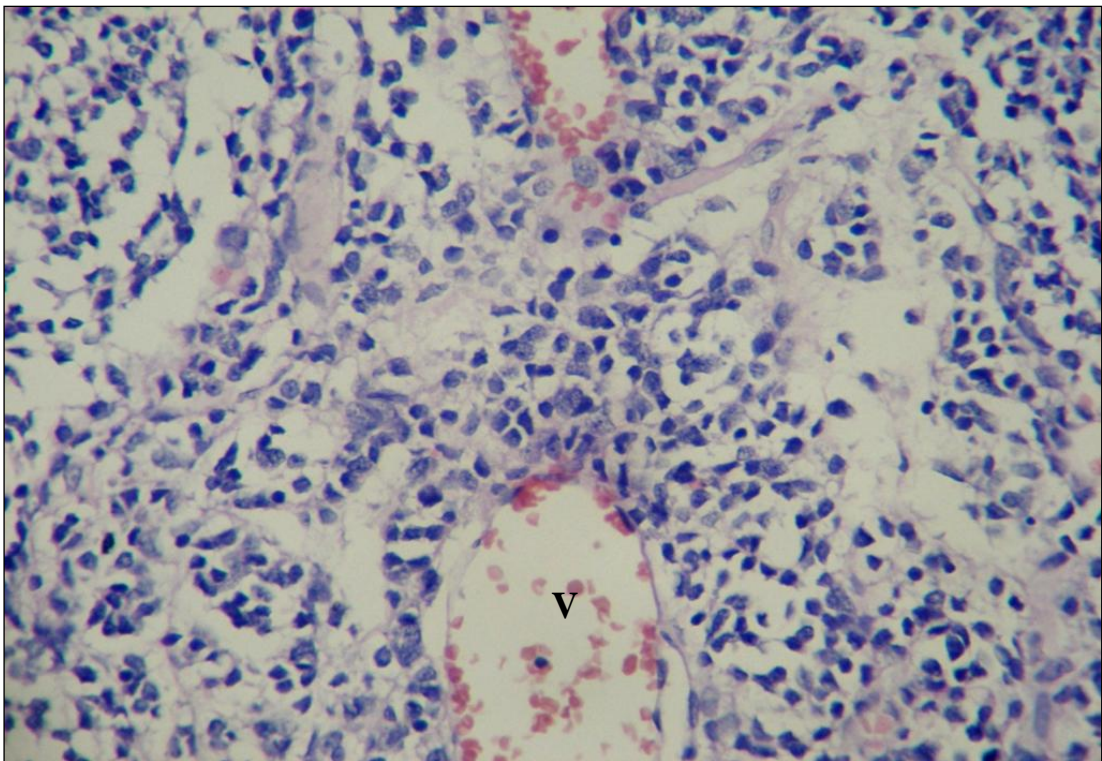


Figura 33: Microfotografía, neuroblastoma con componente vascular (V). H-E 10X.

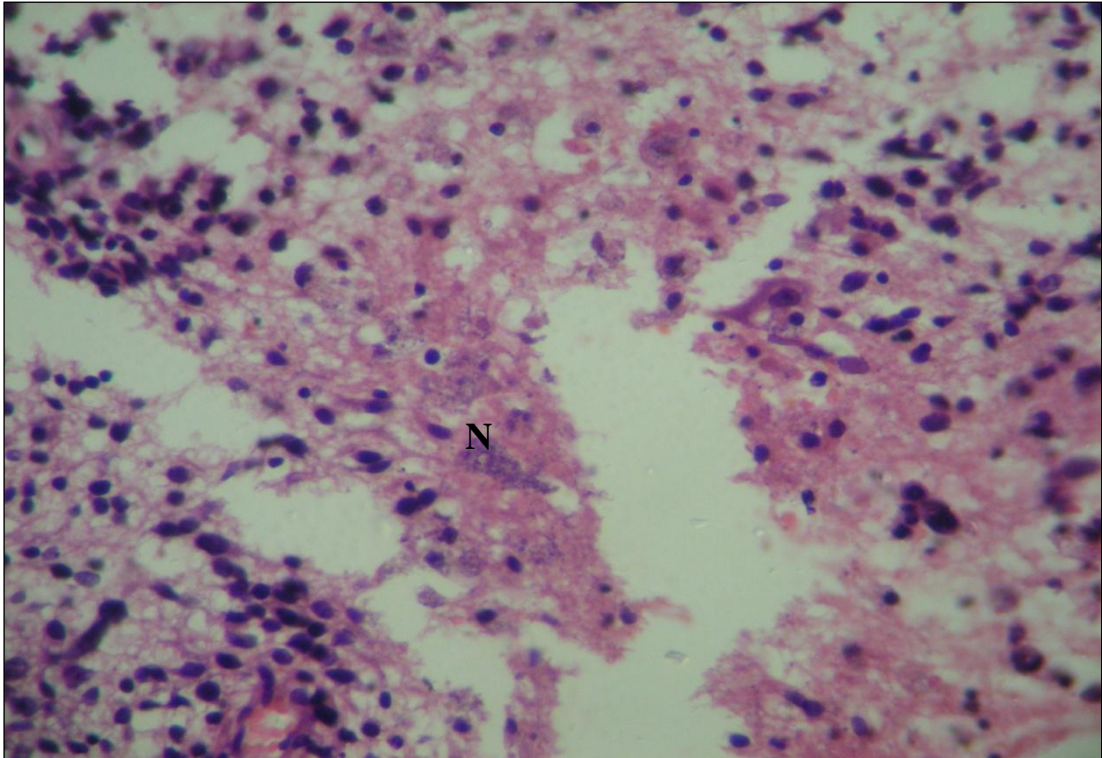


Figura 34: Microfotografía, neuroblastoma con zona de necrosis (N). H-E 40X.

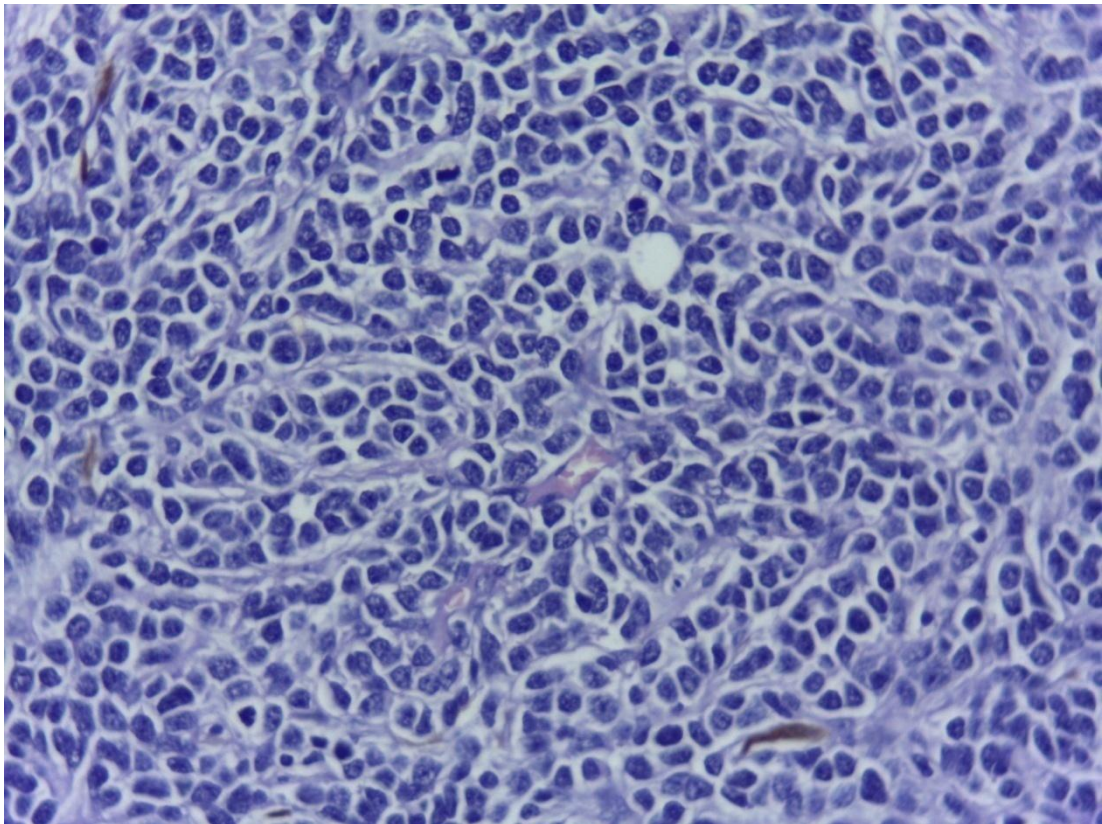


Figura 35: Microfotografía, neuroblastoma, con áreas celulares densas y cordones. H-E 10X.

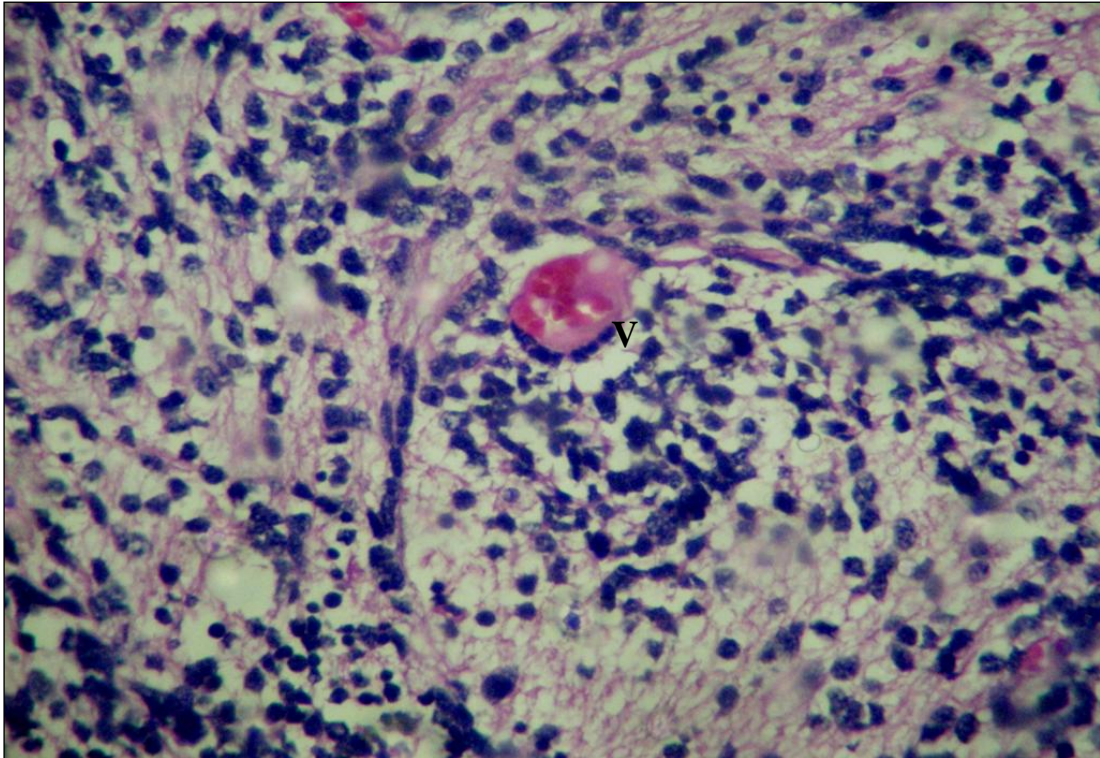


Figura 36: Microfotografía, neuroblastoma con componente vascular (V) en zona de menor densidad celular. H-E 40X.

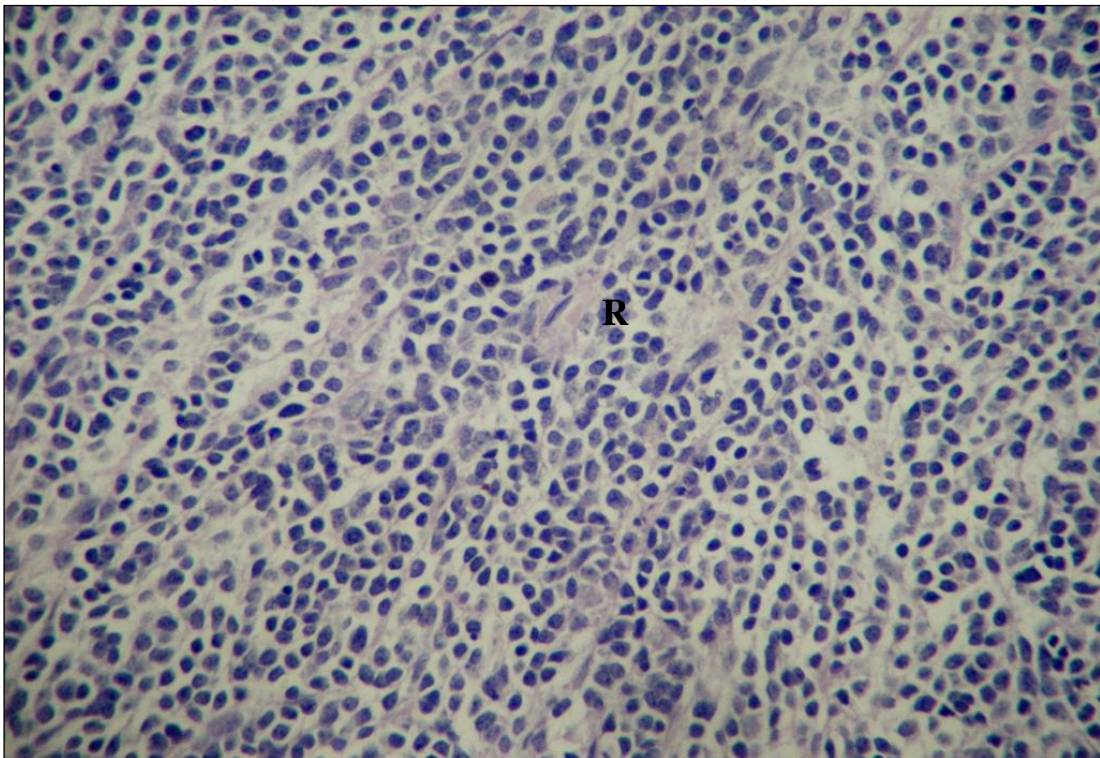


Figura 37: Microfotografía, neuroblastoma, distribución difusa con tendencia a la formación de rosetas (R). 10X.

III-3.4 MICROSCOPIA CON TÉCNICAS ARGÉNTICAS

Con la técnica de plata, Doble Impregnación de Del Río Hortega, se evidenciaron las características morfológicas de estas células.

Se observaron diferenciaciones neurofibrilares, generalmente unipolares, con neurofibrillas generalmente dispuestas cerca del núcleo, o condensadas en la periferia (Figuras 38, 39 y 40). Eran onduladas a veces rectilíneas, y en algunas se observó la formación de una prolongación axónica unipolar (Figura 41). Las expansiones eran muy finas y distribuidas entre las células. En las formas rosetoides las prolongaciones expansivas iban hacia el centro y eran generalmente monopolares. En estas formas rosetoides se observaron también neuroblastos monopolares con expansiones convergentes en una roseta (Figura 42).

En los diferentes tumores observados, se evidenciaron claros neuroblastos bipolares con axones bien diferenciados (Figuras 43, 46, 47 y 48).

Las formas llamadas nodulares/desmoplásicas estaban rodeadas por tejido conectivo reticular (Figuras 44 y 45). Esta trama colágeno reticular puede ser escasa en algunos neuroblastomas.

También se observaron rosetas con luz.

La caracterización típica y distintivas de las células con la técnica de plata mostró una o varias neurofibrillas citoplasmáticas perinucleares (Figura 39).

Todos los casos estudiados mostraron tinción positiva para las técnicas de plata (Tablas 13, 14, 15, 16 y 17).

Del total de casos estudiados no se observó que entre los dos patrones histológicos (nodular y difuso) haya características particulares y distintivas en relación con la tinción de plata.

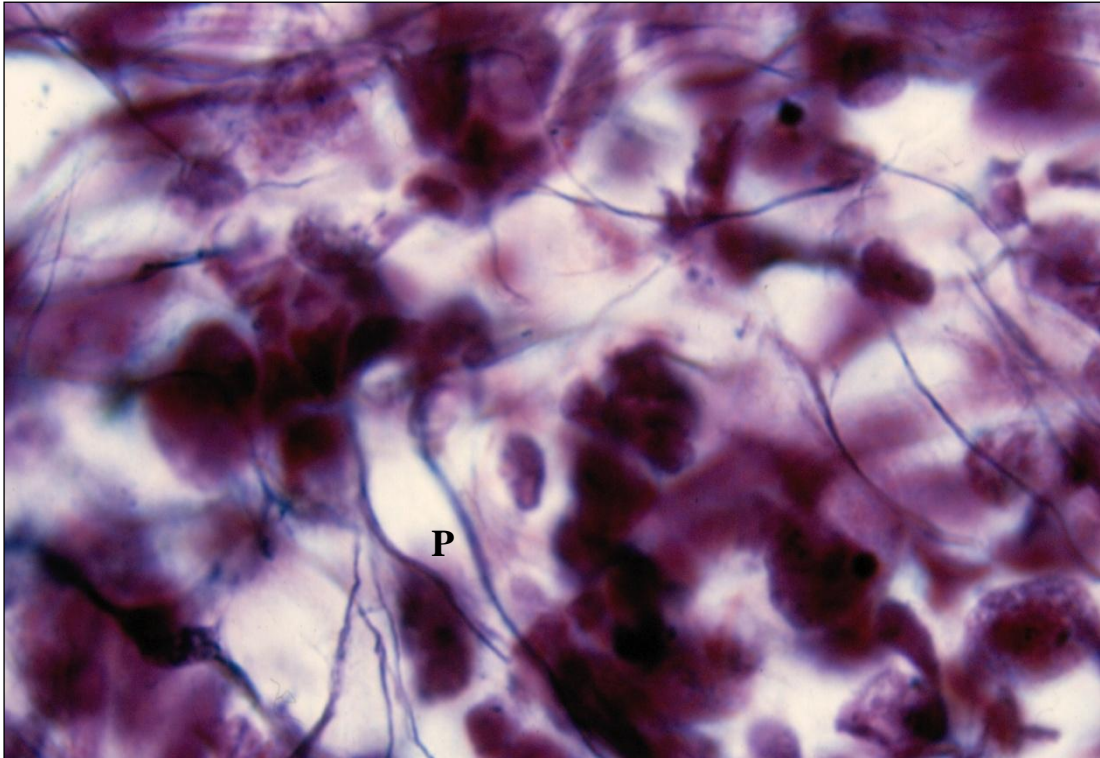


Figura 38: Microfotografía, neuroblastoma, técnica de doble impregnación argéntica de Del Río Hortega. Obsérvese las prolongaciones neurofibrilares (P). 100X.

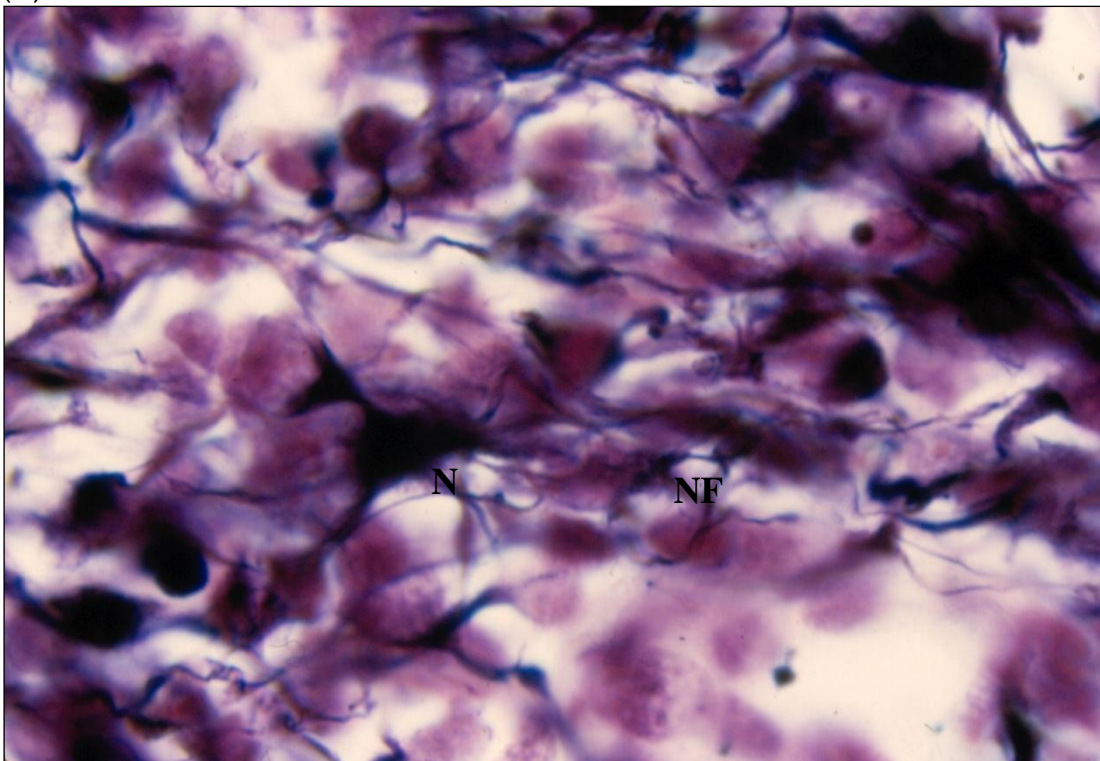


Figura 39: Microfotografía, neuroblastoma. Técnica de doble impregnación argéntica de Del Río Hortega, observándose neuroblastos (N) y neurofibrillas (NF). 100X.

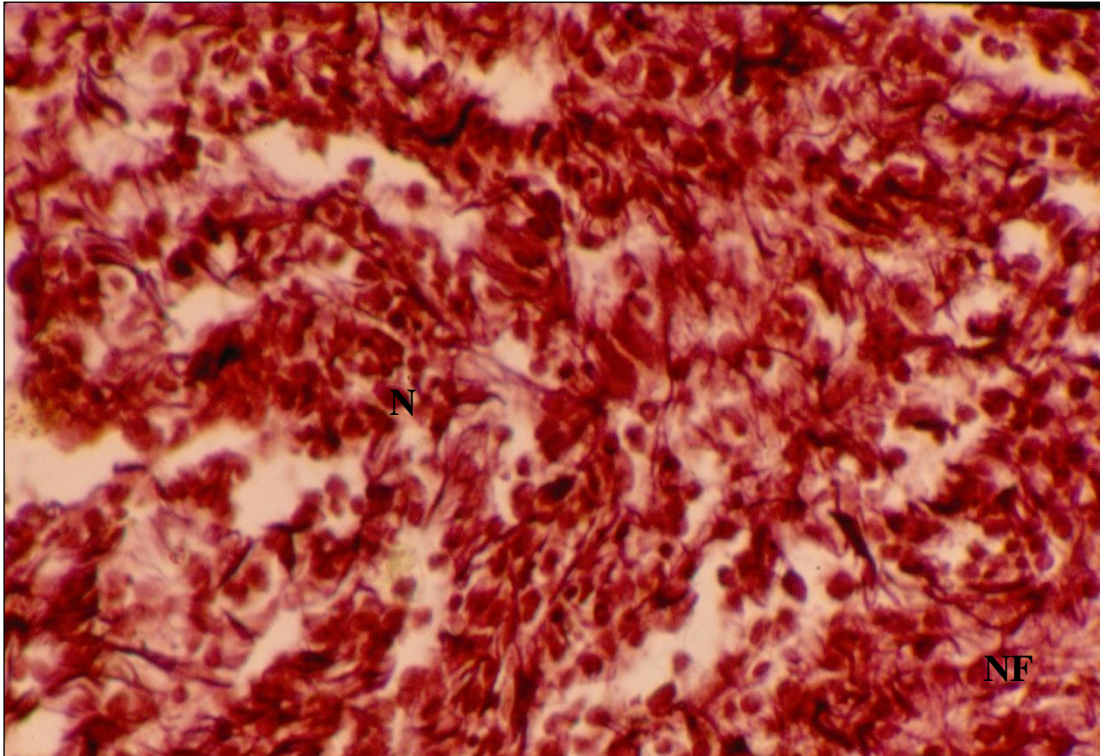


Figura 40: Microfotografía, neuroblastoma. Técnica de doble impregnación argéntica de Del Río Hortega, observándose neuroblastos (N) y prolongaciones neurofibrilares (NF). 10X.

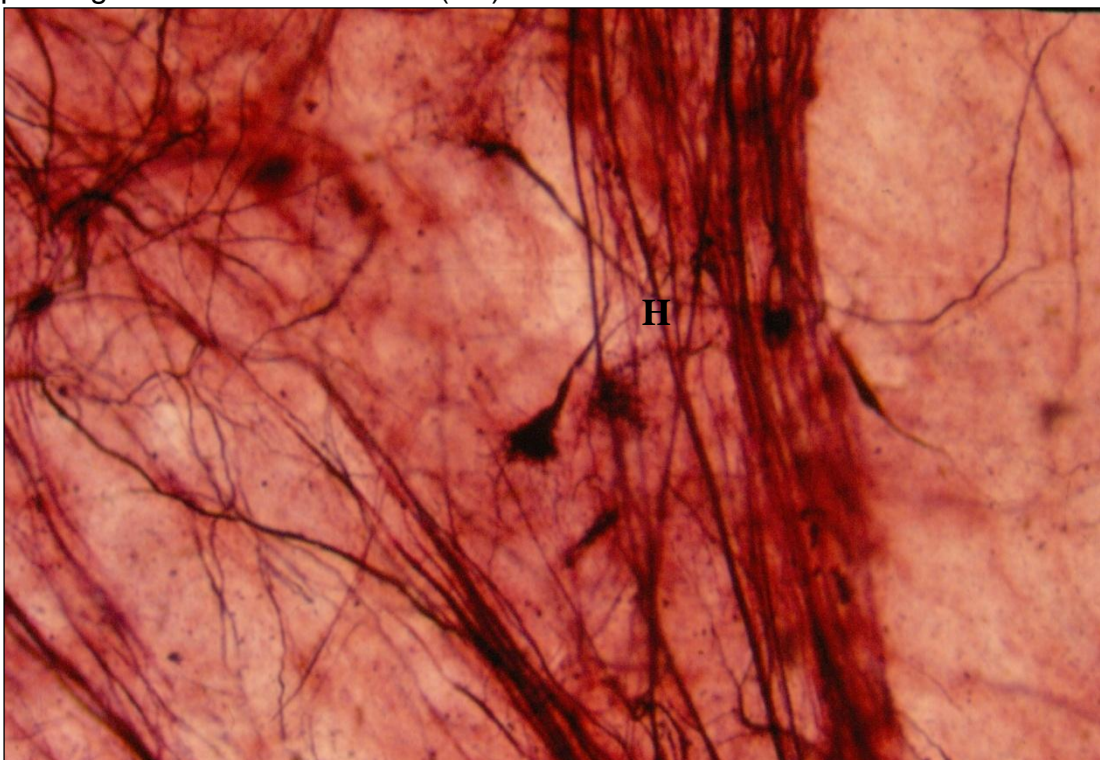


Figura 41: Microfotografía, neuroblastoma. Técnica de Del Río Hortega, obsérvese haces axónicos (H) en neuroblastos. 10X.

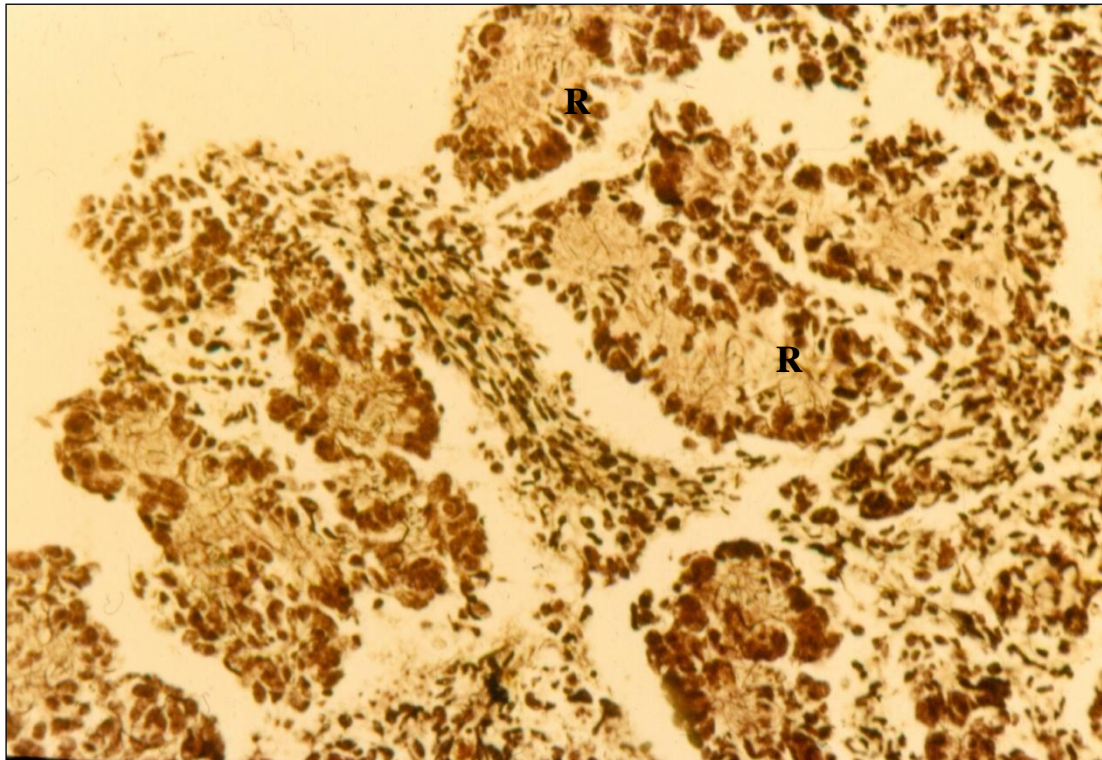


Figura 42: Microfotografía, neuroblastoma. Técnica de doble impregnación argéntica. Rosetas (R) con axones hacia el centro.10X.

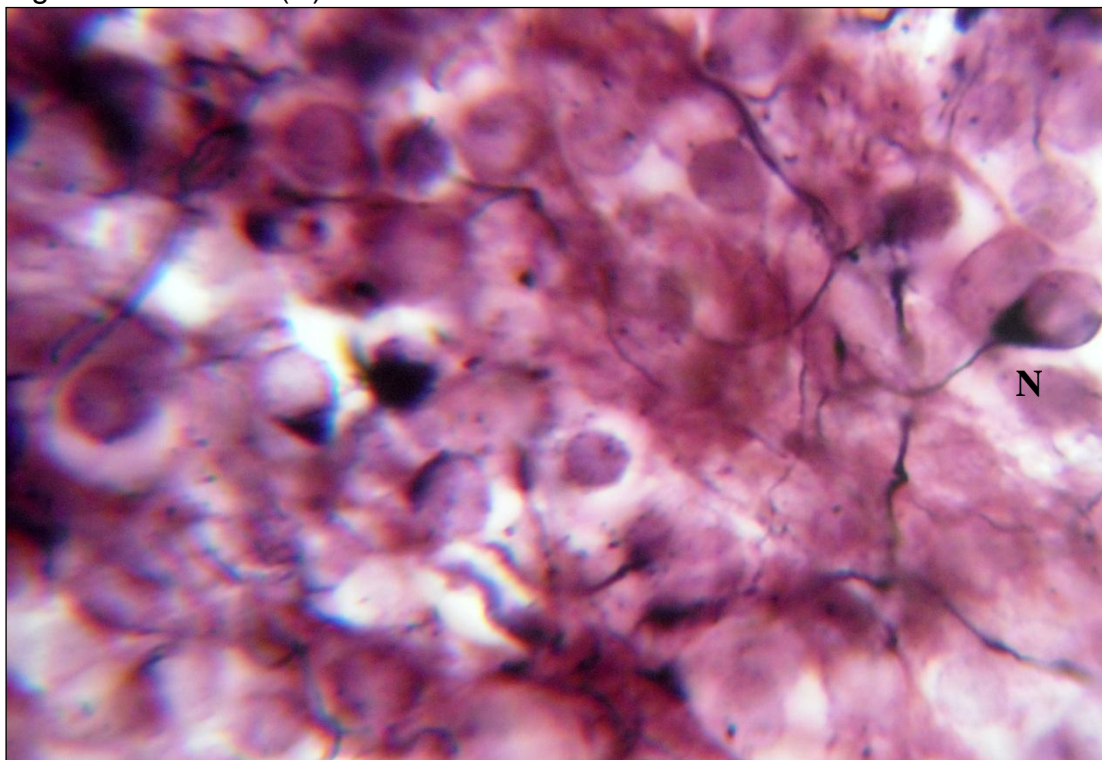


Figura 43: Microfotografía, neuroblastoma. Técnica de doble impregnación argéntica, con claros neuroblastos (N). 100X.

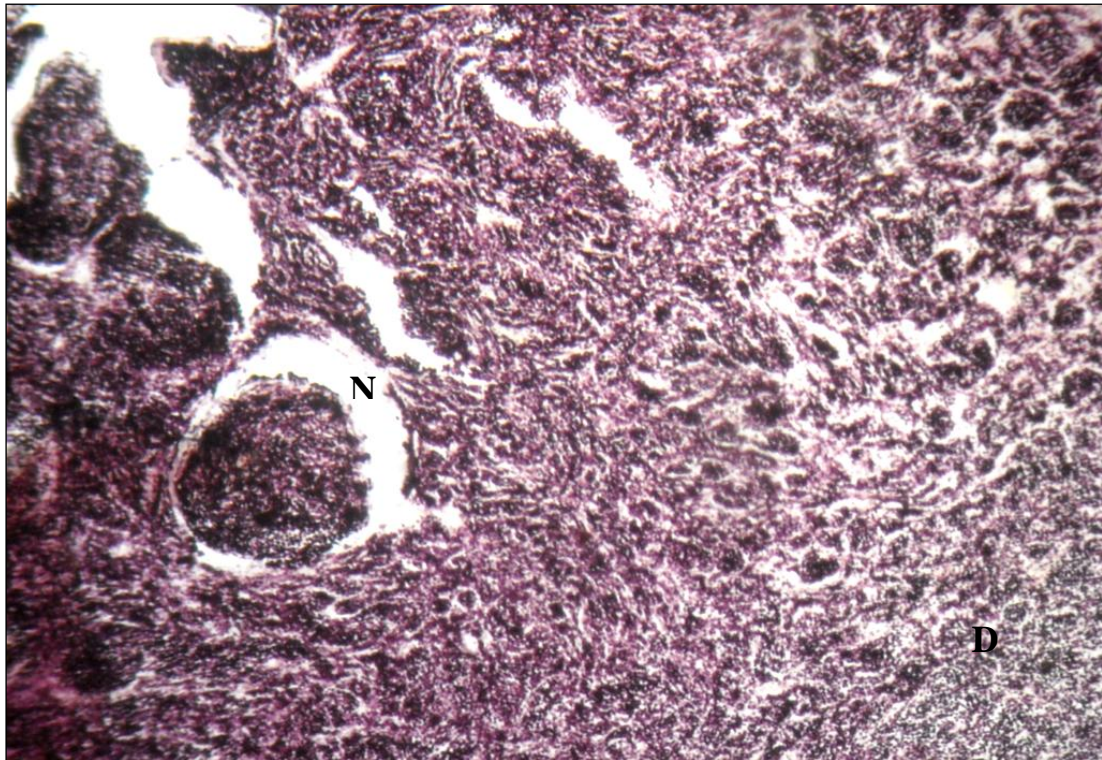


Figura 44: Microfotografía, neuroblastoma técnica de Doble impregnación argéntica de Del Río Hortega. Se observaron áreas nodulares (N) y difusas (D) 10X.

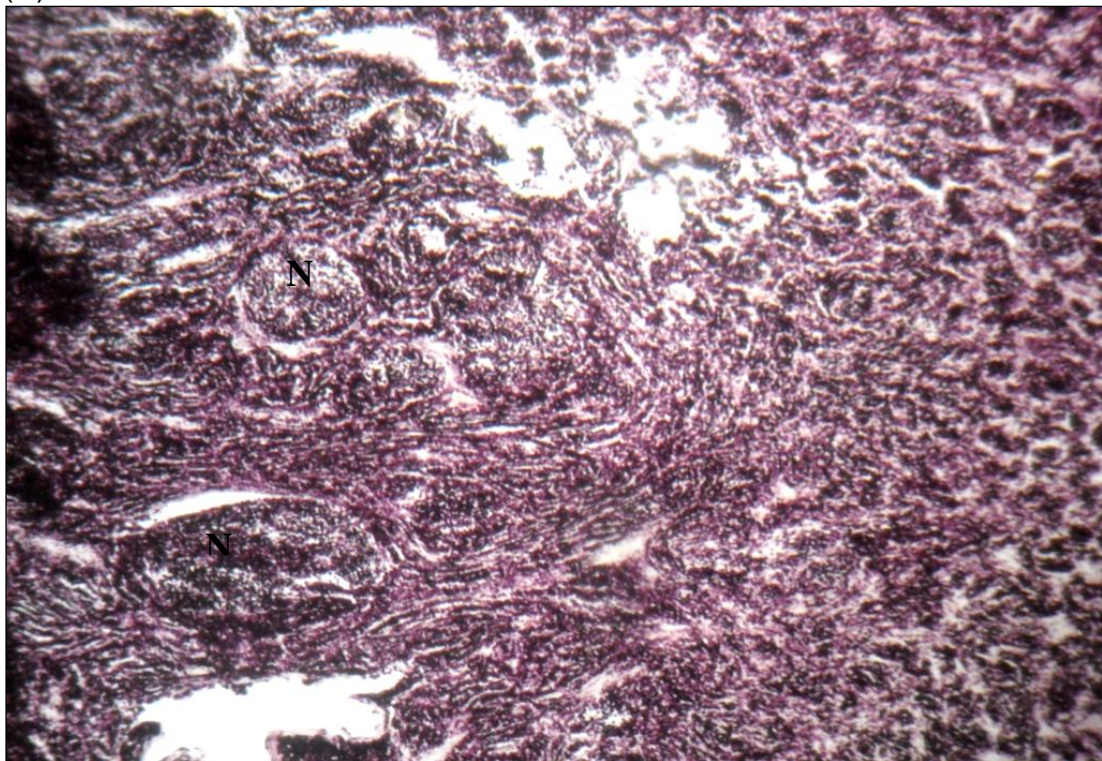


Figura 45: Microfotografía, neuroblastoma técnica de Doble impregnación argéntica de Del Río Hortega, áreas nodulares (N). 10X.

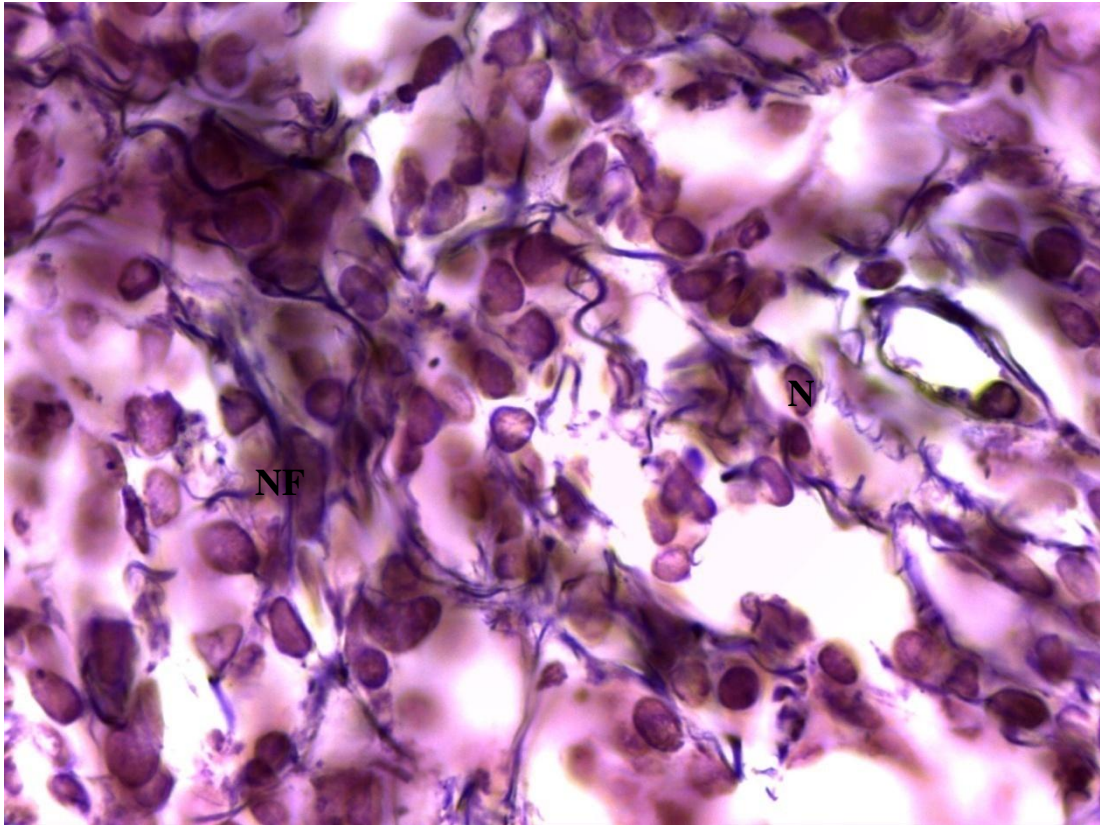


Figura 46: Microfotografía, neuroblastoma. Doble impregnación argéntica demostrando neuroblastos (N) y neurofibrillas (NF). 100X.

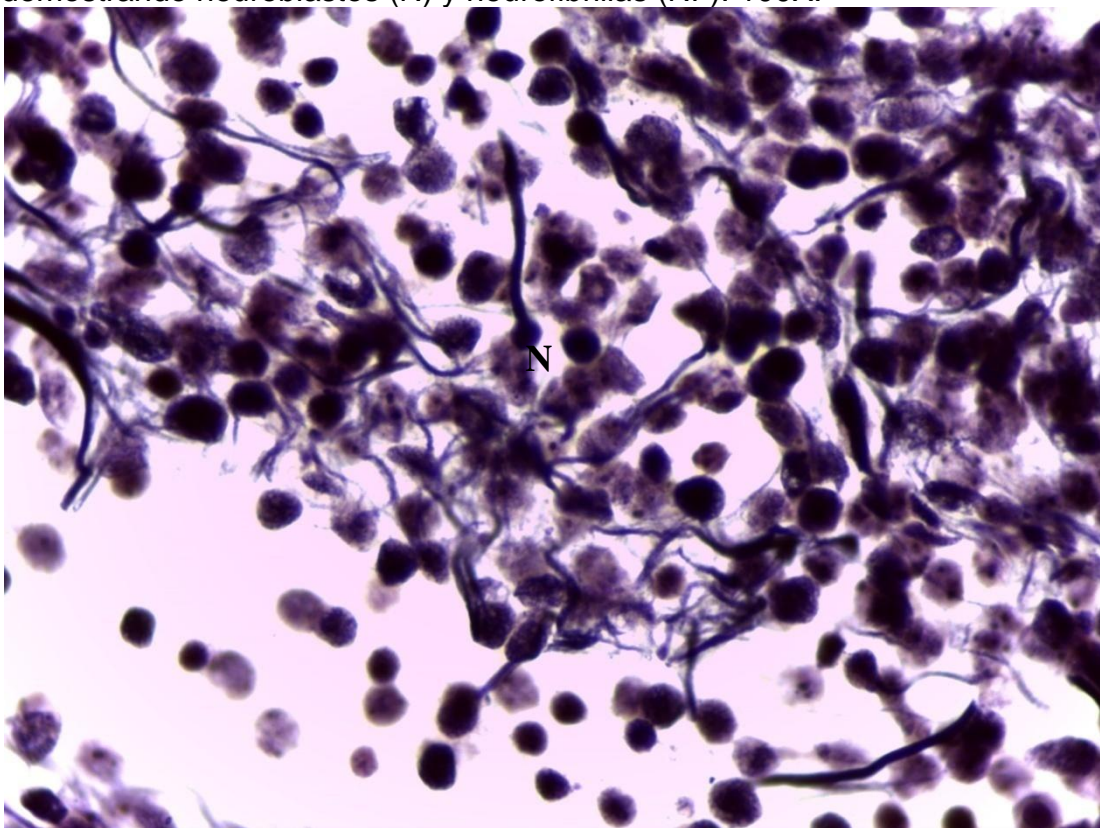


Figura47: Microfotografía, neuroblastoma. Neuroblastos (N) con Doble impregnación argéntica 100X.

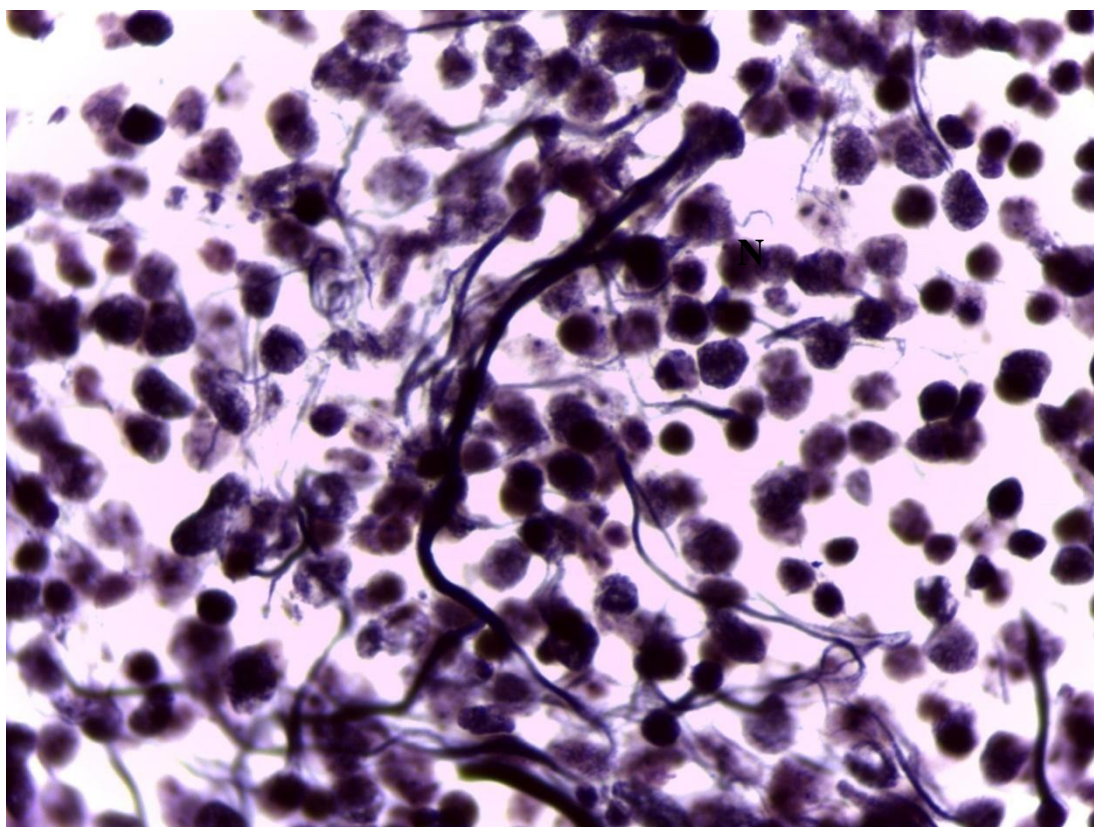


Figura 48: Microfotografía, neuroblastoma. Neuroblastos (N) con técnica de doble impregnación argéntica. 100X.

III-3.5 MARCADORES TUMORALES. PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO

De los 33 casos estudiados se realizó el siguiente panel de inmunohistoquímica: Syn, GFAP y Ki 67, con los siguientes resultados (Tabla 12):

Tabla 12: Panel de técnicas inmunohistoquímicas realizados en los diferentes grupos etarios.

Grupos etarios	Sinaptofisina	GFAP	Ki67
0-9 años	Positivo 96,97%	Negativo 100%	Alto >50%
10-19 años	Positivo 100%	Negativo 100%	Alto >50%
20-29 años	Positivo 100%	Negativo 100%	Alto >50%

A la observación de las técnicas de inmunohistoquímica con Syn en todos los tumores estudiados, menos en un caso, se evidenció diferenciación inmunofenotípica neuronal con diferentes grados de intensidad, según los neuroblastomas estudiados.

Se valoró expresión e intensidad de este marcador. La expresión se valoró positiva o negativa.

La intensidad de la tinción se caracterizó como ++/3+ (moderada) y +++/3+ (fuerte).

En los neuroblastomas dispuestos en forma difusa la expresión de Syn fue uniforme en las células (Figuras 49, 50 y 51).

En los neuroblastomas de tipo nodular la expresión de sinaptofisina fue claramente evidenciada en las zonas nodulares (Figura 52).

Con la técnica de GFAP todas las células neoplásicas fueron negativas (Figuras 53 y 54). Evidenciándose sólo glía reactiva o remanente.

El índice de proliferación celular fue alto en más del 50% en todos los casos aunque en las áreas nodulares fue más bajo que en las áreas difusas (Figuras 55 y 56).

Tanto en el patrón nodular como difuso predominó en un 53,85% (n 7) y 65% (n 13) respectivamente la marcación con Syn intensidad ++/3+ (moderada) (Tabla 14). La tinción ARG, fue positiva en el 100% de los casos y la GFAP fue negativa en el 100% (Tabla 14).

En cuanto a la expresión de Syn se observó que predominó la marcación ++/3+ (moderada) con el 60,61 % (Tabla 15).

En tanto que GFAP fue negativa en el 100 % de los casos (Tabla 15).

La inmunomarcación con Syn mostró que de los 33 casos estudiados el 96,97% fue positivo, en diversos grados de intensidad, siendo el 60,61% (n 20) de intensidad ++/3+ (moderada) y 36,36% (n 12) de intensidad +++/3+ (fuerte). El 3,03% (n 1) fue negativo para este biomarcador (Tablas 15 y 16).

De manera significativa ($p < 0.05$) se observó que el uso de sinaptofisina y técnicas de plata fueron ambas positivas, en el 96,97% (n 32) de los casos para la determinación del inmunofenotipo neuronal del neuroblastoma; y el 3,03% (n 1) fue sinaptofisina negativa y tinción de plata positiva (Tablas 16 y 17).

La inmunomarcación con GFAP, resultó ser negativa (en células tumorales) en el 100% de los casos estudiados (n 33) (Figuras 55 y 56) (Tablas 16 y 17).

El estudio del índice de proliferación con el anticuerpo Ki 67 mostró que en el 100% (n 33) de los casos estudiados fue alto, observándose en todos una marcación de más del 50 %, siendo de menor expresión en áreas nodulares (Figuras 55 y 56).

Tabla 13: Tinción argéntica, expresión de Syn y GFAP en relación al patrón histológico.

<u>Patrón histológico</u>	<u>1:0:0</u>	<u>1:2:0</u>	<u>1:3:0</u>	<u>Total</u>
1	1	7	5	13
2	0	13	7	20
<u>Total</u>	<u>1</u>	<u>20</u>	<u>12</u>	<u>33</u>

Frecuencias absolutas.

En columnas: ARG.:Syn:GFAP.

ARG: tinción argéntica, 1 (positiva).

SYN: sinaptofisina, 0 (negativa), 2 (intensidad moderada ++/3+), 3 (intensidad fuerte +++/3+).

GFAP: proteína gliofibrilar ácida, 0 (negativo).

Patrón Histológico: 1: nodular, 2: difuso.

Tabla 14: Tinción argéntica, expresión de Syn y GFAP en relación al patrón histológico.

<u>Patrón histológico</u>	<u>1:0:0</u>	<u>1:2:0</u>	<u>1:3:0</u>	<u>Total</u>
1	7.69	53.85	38.46	100.00
2	0.00	65.00	35.00	100.00
<u>Total</u>	<u>3.03</u>	<u>60.61</u>	<u>36.36</u>	<u>100.00</u>

Frecuencias relativas por filas (expresadas como porcentajes).

En columnas: ARG.:Syn:GFAP.

ARG: tinción argéntica, 1 (positiva).

SYN: sinaptofisina, 0 (negativa), 2 (intensidad moderada ++/3+), 3 (intensidad fuerte +++/3+).

GFAP: proteína gliofibrilar ácida, 0 (negativo).

Patrón Histológico: 1: nodular, 2: difuso.

Tabla 15: Tinción argéntica, expresión de Syn y GFAP en relación al patrón histológico

<u>Patrón histológico</u>	<u>1:0:0</u>	<u>1:2:0</u>	<u>1:3:0</u>	<u>Total</u>
1	3.03	21.21	15.15	39.39
2	0.00	39.39	21.21	60.61
<u>Total</u>	<u>3.03</u>	<u>60.61</u>	<u>36.36</u>	<u>100.00</u>

Frecuencias relativas al total (expresadas como porcentajes).

En columnas: ARG.:Syn:GFAP.

ARG: tinción argéntica, 1 (positiva).

SYN: sinaptofisina, 0 (negativa), 2 (intensidad moderada ++/3+), 3 (intensidad fuerte +++/3+).

GFAP: proteína gliofibrilar ácida, 0 (negativo).

Patrón Histológico: 1: nodular, 2: difuso.

Tabla 16: Tinción argéntica en relación a la expresión de Syn y GFAP.

<u>GFAP</u>	<u>1:0</u>	<u>1:2</u>	<u>1:3</u>	<u>Total</u>
0	1	20	12	33
<u>Total</u>	<u>1</u>	<u>20</u>	<u>12</u>	<u>33</u>

Frecuencias absolutas.

En columnas: ARG.:Syn.

ARG: tinción argéntica, 1 (positiva).

Syn: sinaptofisina, 0 (negativa), 2 (intensidad moderada ++/3+), 3 (intensidad fuerte +++/3+).

GFAP: proteína gliofibrilar ácida, 0 (negativo).

Tabla 17: Tinción argéntica en relación a la expresión de Syn y GFAP.

<u>GFAP</u>	<u>1:0</u>	<u>1:2</u>	<u>1:3</u>	<u>Total</u>
0	3.03	60.61	36.36	100.00
<u>Total</u>	<u>3.03</u>	<u>60.61</u>	<u>36.36</u>	<u>100.00</u>

Frecuencias relativas por filas (expresadas como porcentajes).

En columnas: ARG.:Syn.

ARG: tinción argéntica, 1 (positiva).

Syn: sinaptofisina, 0 (negativa), 2 (intensidad moderada ++/3+), 3 (intensidad fuerte +++/3+).

GFAP: proteína gliofibrilar ácida, 0 (negativo).

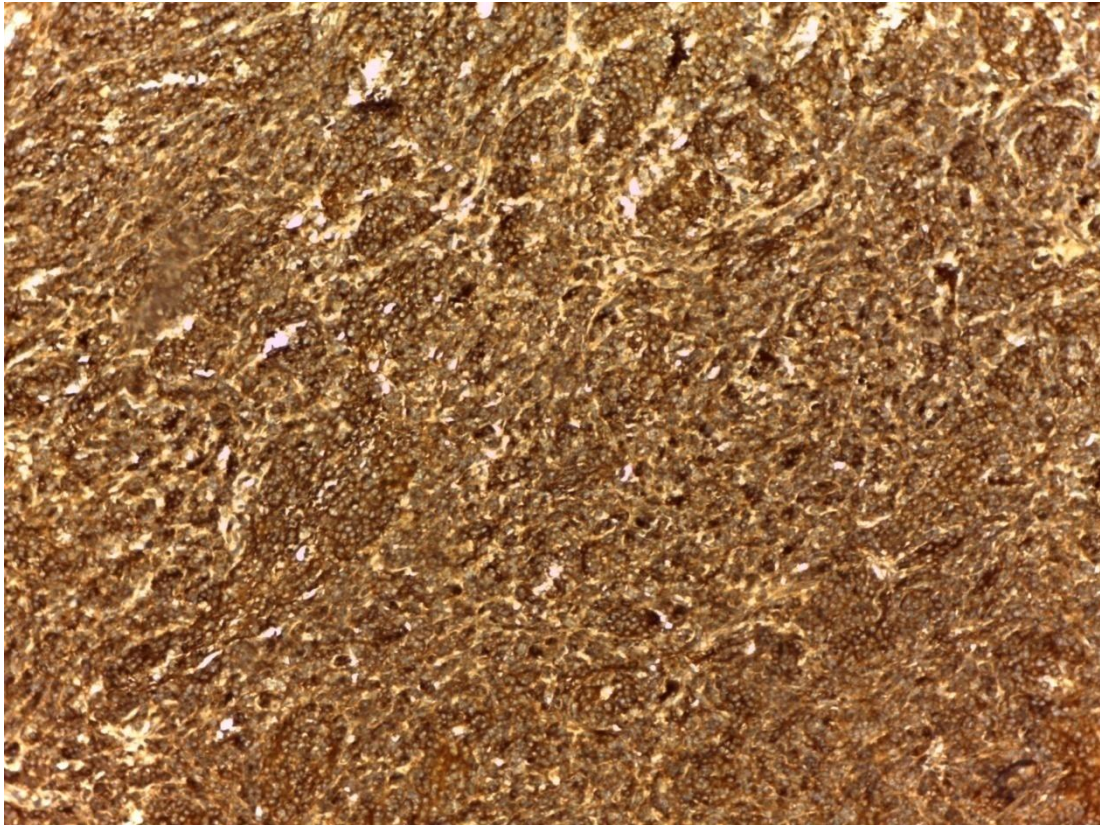


Figura 49: Microfotografía, neuroblastoma difuso, técnica de inmunohistoquímica mostrando positividad difusa para Syn. 10X.

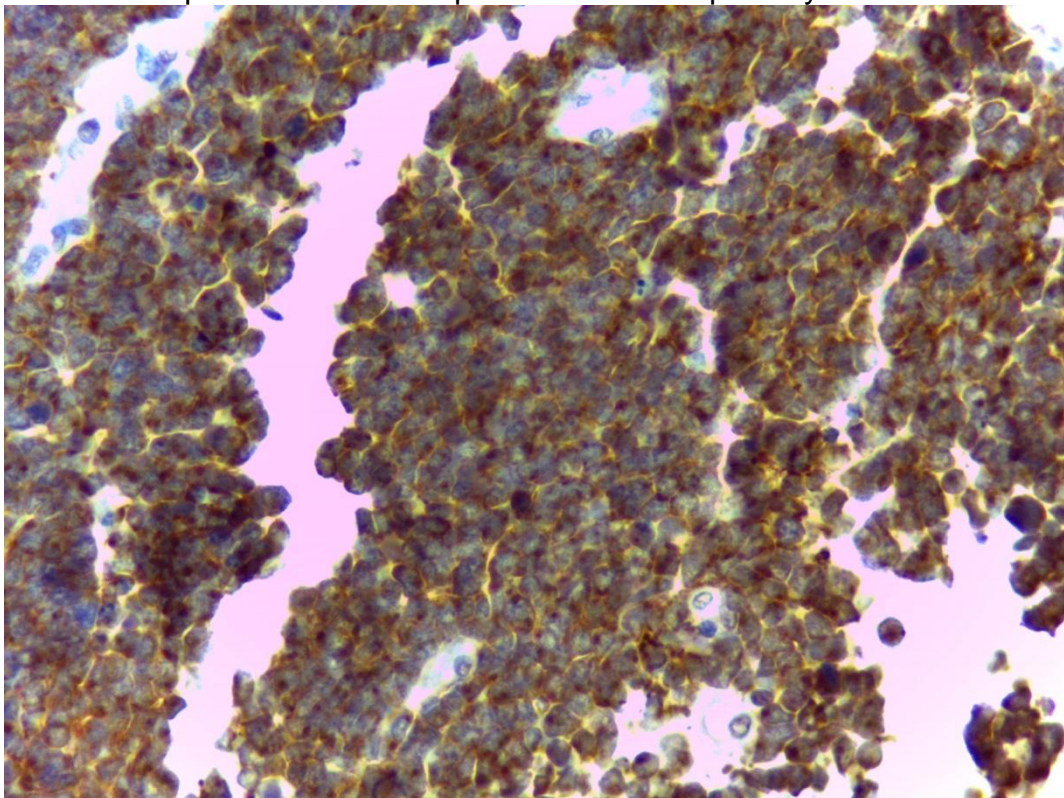


Figura 50: Microfotografía, neuroblastoma con técnica de inmunohistoquímica para Syn en área difusa. Tinción citoplasmática. 40X.

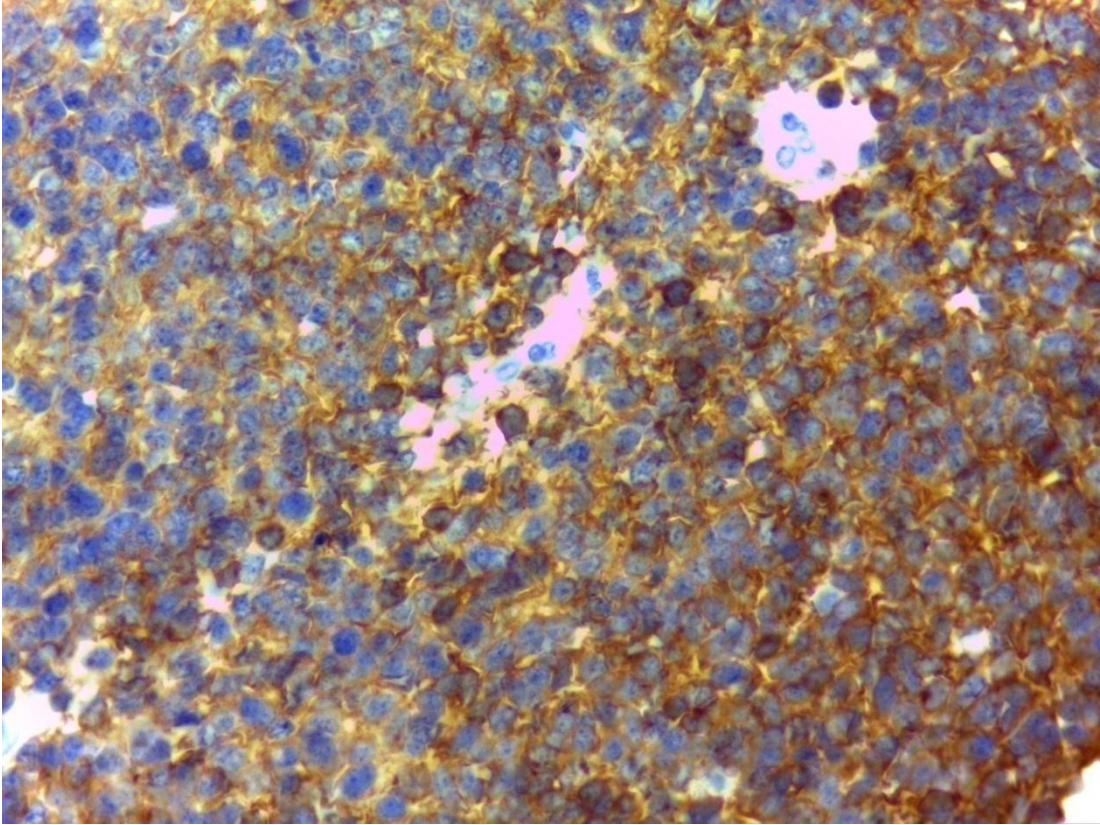


Figura 51: Microfotografía, neuroblastoma con técnica de inmunohistoquímica para Syn en área difusa. Tinción citoplasmática. 40X.

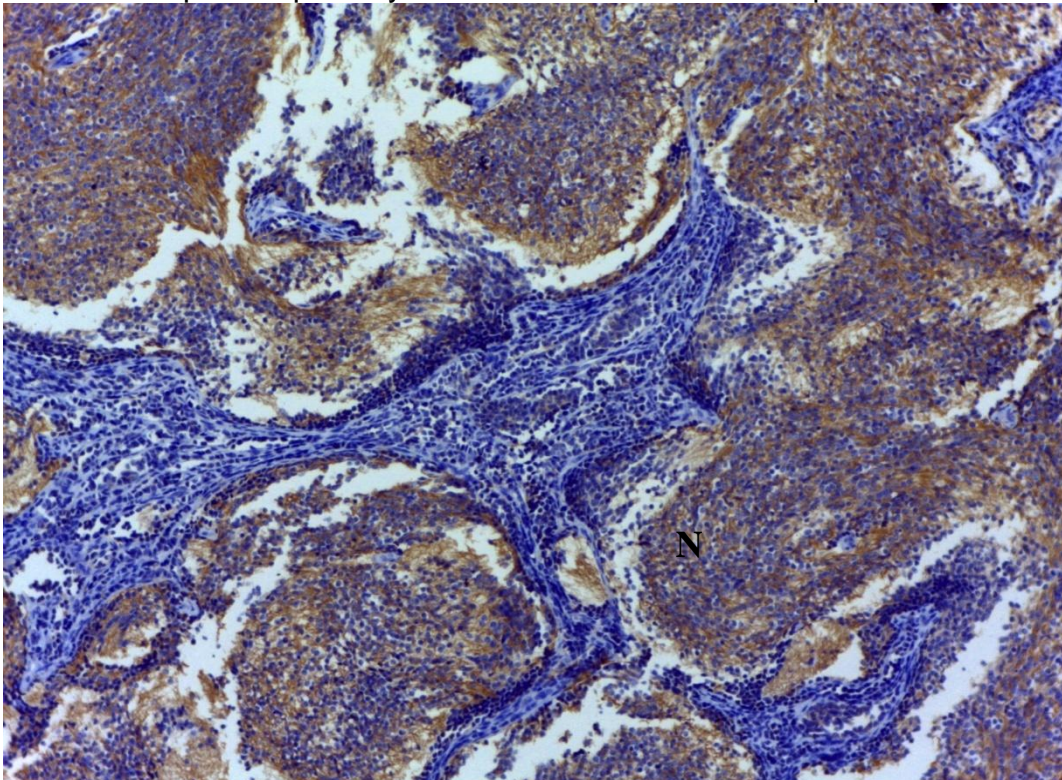


Figura 52: Microfotografía, neuroblastoma con técnica de inmunohistoquímica para Syn en áreas nodulares (N). 10X.

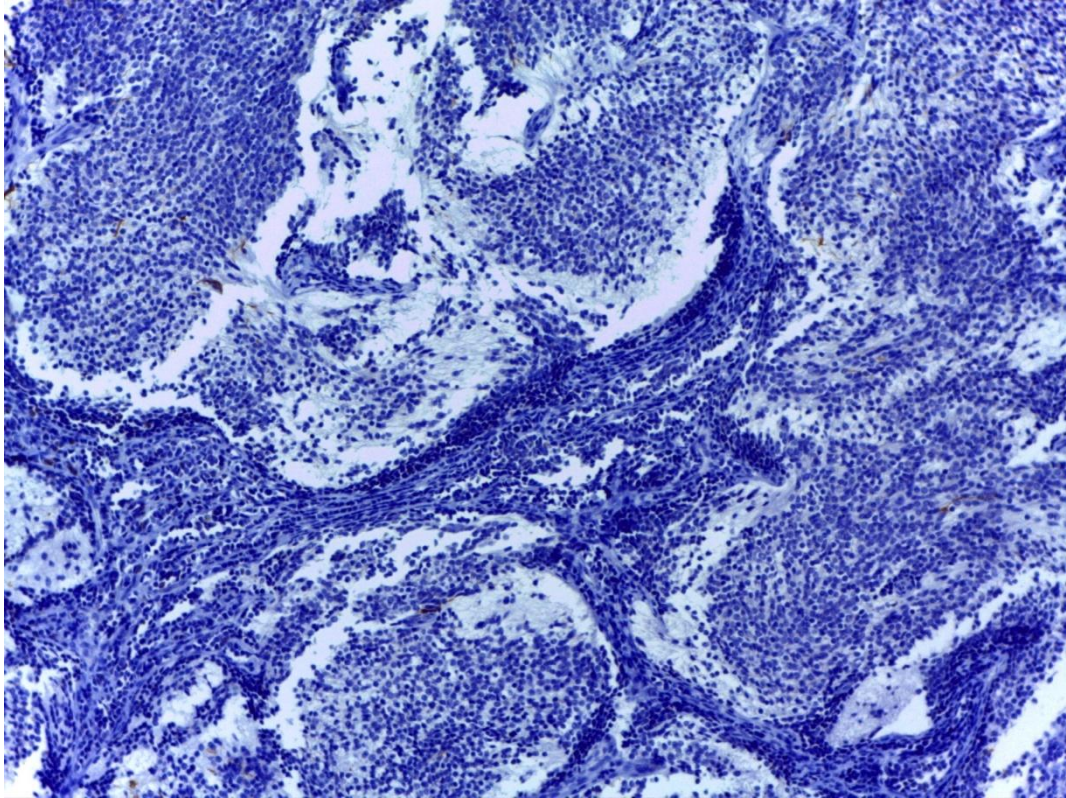


Figura 53: Microfotografía, neuroblastoma con técnica de inmunohistoquímica negativa para GFAP. 10X.

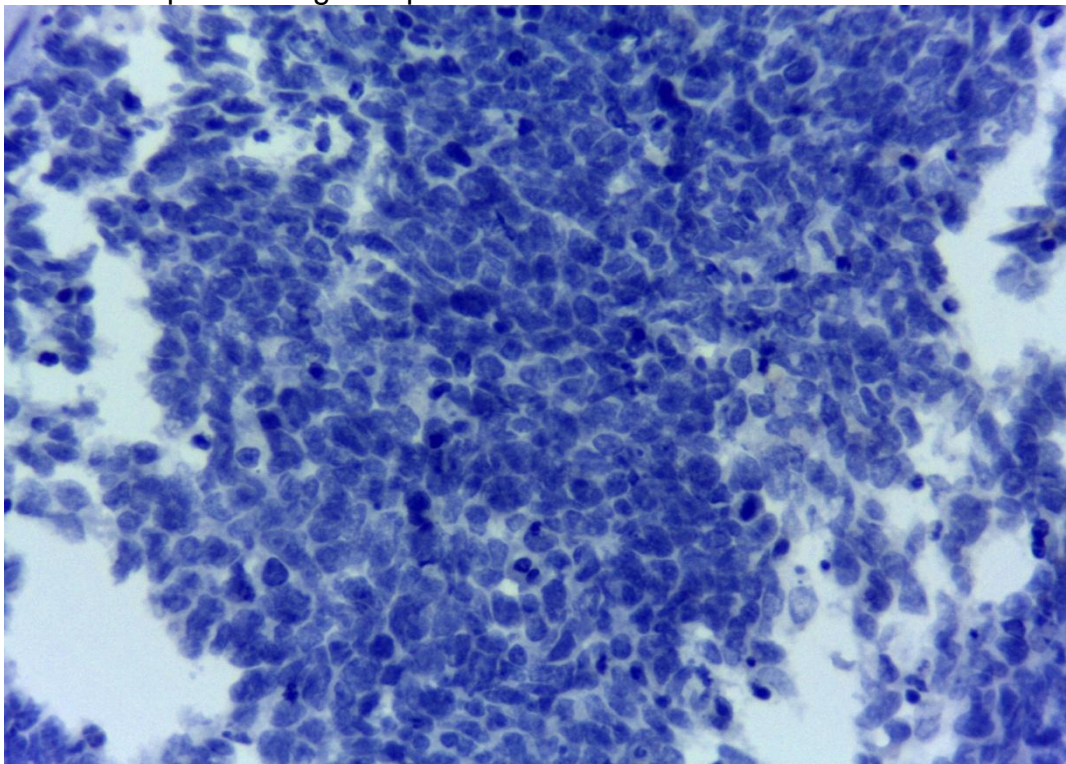


Figura 54: Microfotografía, inmunohistoquímica negativa para GFAP. 40X.

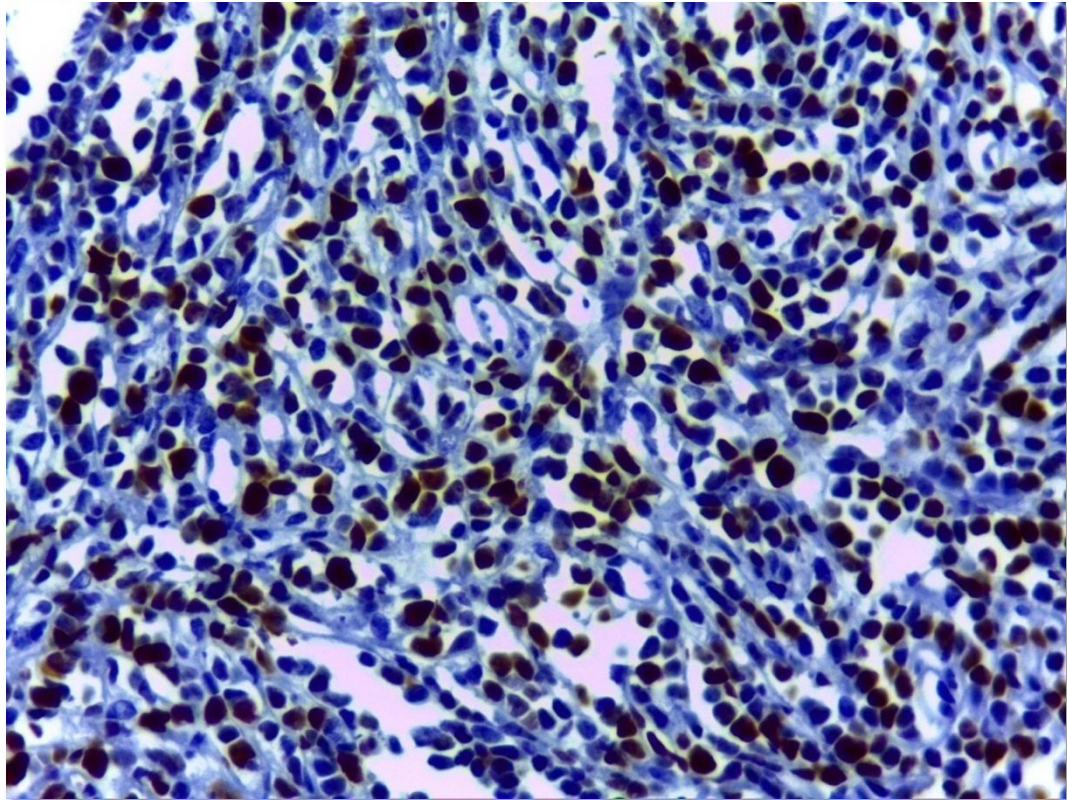


Figura 55: Microfotografía, neuroblastoma con técnica de inmunohistoquímica para Ki67 con marcación nuclear. 40X.

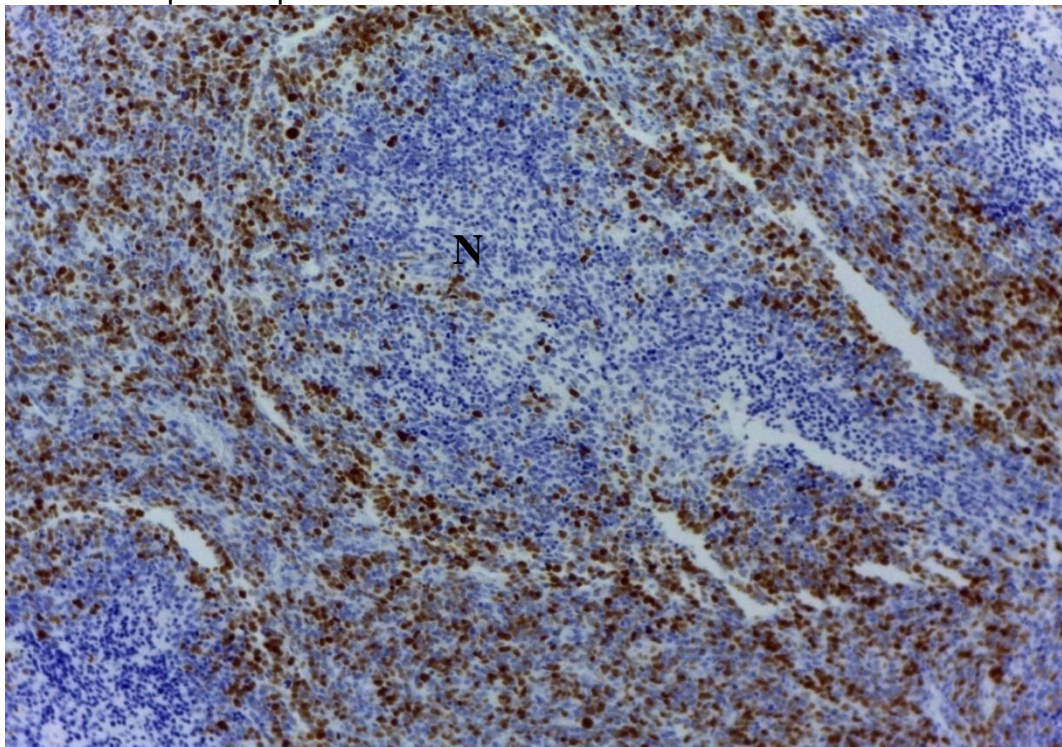


Figura 56: Microfotografía, neuroblastoma con técnica de inmunohistoquímica para Ki67, menor expresión en áreas nodulares(N), marcación nuclear. 10X.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Se analizaron los resultados obtenidos teniendo en cuenta variables demográficas como sexo y edad. Posteriormente se describieron comparativamente los hallazgos morfológicos de los neuroblastomas estudiados con técnicas de hematoxilina-eosina, técnicas de plata y panel de inmunohistoquímica para Syn, GFAP y ki67.

Para el grupo de 0 a 9 años, 21 casos correspondieron al 63,64 % con predominio del sexo femenino.

En el grupo de 10 a 19 años, 5 casos, correspondieron al 15,15 % con predominio del sexo masculino.

En el grupo de 20 a 29 años, 7 casos, correspondió al 21,21 % del total de casos y fue en sexo masculino.

Podemos decir que acuerdo a la edad y sexo, el neuroblastoma, predomina a edad temprana en sexo femenino, y a mayor edad se observa predominio en sexo masculino.

Del total de casos el 93,93% macroscópicamente llegaron en varios fragmentos, el mayor de 6cm de diámetro y el menor de 0,2 cm respectivamente.

El 6,06% llegaron en un solo fragmento, el mayor de 6 cm de diámetro y el menor de 5 cm.

IV-1 CONCEPTOS HISTOGENÉTICOS Y COMPARACIÓN ENTRE AMBOS MÉTODOS

La trama de la discusión fundamental en base a los objetivos propuestos y a los resultados obtenidos se realiza como sigue:

Las neoplasias poco diferenciadas del parénquima nervioso, neuronal, glial, microglial tienen imágenes citológicas similares teñidas con técnicas de hematoxilina-eosina, por lo que es necesario utilizar con otras técnicas, para diferenciarlas.

Esto además nos lleva a plantear cómo son estas células, de diferente estirpe en estado desdiferenciado, que por otro lado son las bases de las clasificaciones. Por lo que es necesario conocer los fundamentos de las clasificaciones y morfología de las células en cuestión.

La controversia planteada en este trabajo es la existencia del neuroblastoma cerebelar y su origen neuronal, reafirmando el concepto de Del Río Hortega que los meduloblastomas representan tumores neuroblásticos cerebelares y ninguno de los elementos ofrecen la bipotencialidad o ambigüedad que les son atribuidos.

Estos 3 puntos son la base de la discusión que analizaremos sucesivamente:

Las características nucleares no son distintivas para diferenciarlos, por el contrario es la base de la confusión, los núcleos son grandes, irregulares, con mucha actividad mitótica, y a veces con nucleolos evidentes.

Los neuroblastomas o meduloblastomas son tumores que muestran con técnicas de anilinas H-E una distribución en amplias sábanas o en cúmulos relativamente pequeños, otros en banda, empalizada, o nodulares desmoplásicos.

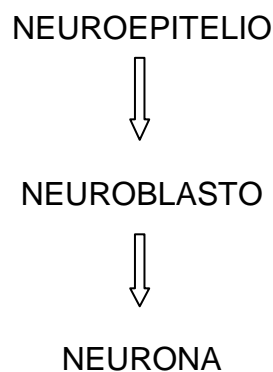
Por eso se pueden describir numerosos de estos rasgos y otros pero lo que distingue y se los ha podido identificar es por sus prolongaciones celulares, axónicas, dendríticas y de diferenciación neurofibrilar intracitoplasmática.

Para caracterizar o para observar en el microscopio estos rasgos es necesario tener técnicas adecuadas y las conocidas son las de Cajal y Del Río Hortega, como se ha ilustrado.

Actualmente además se la puede identificar con técnicas de inmunomarcación, como las realizadas.

“Del Río Hortega estudiando los tumores del SNC y en particular los derivados de la neurona, realizó el estudio comparando la estructura de las células tumorales con las células normales en el desarrollo embriológico del SN, es decir microanatomía comparada, cuya histogénesis se realizó en humanos, animales, aves etc. (16, 21).

La secuencia estructural del tejido normal es:



Del Río Hortega observó estas células y las homologó con la embriogénesis, por lo que concluyó que los tumores que tenían diferenciación neuronal los llamó neurocitomas, los desdiferenciados neuroblastomas y neuroepiteliomas.

Nosotros realizando las técnicas argénticas de Del Río Hortega en el material estudiado hemos conseguido resultados similares (Figuras 38, 39, 40).

Para responder a la tercera pregunta se debe tener en cuenta claramente como es la histología de estos tumores con técnicas de impregnaciones y luego comparar con técnicas de inmunohistoquímica.

Con las primeras las células se disponen en nódulos, amplias sabanas, en bandas o empalizadas, delicadamente flexuosas, en algunas predominantemente con rosetas.

Las rosetas son agrupaciones celulares dispuestas en forma circulares con lumen central ocupada por las prolongaciones axónicas de los neuroblastos. En todos nuestros casos estudiados con las técnicas de impregnación metálica y de inmunohistoquímica (cuyas técnicas analizaremos más adelante) pudimos comprobar que fueron neuroblastomas y podemos informar que las imágenes de los neuroblastos observadas son semejantes a las de Del Río Hortega-Polak y otros autores (2).

Los neuroblastos con técnicas de plata presentaron en su citoplasma una o varias fibrillas dispuestas próximas al núcleo o condensadas en la periferia, algo onduladas o rectas con tendencia a la formación de una prolongación axónica (Figuras 38, 39, 40 y 41).

En sectores conformaban rosetas (Figura 42).

En las zonas nodulares se evidenciaron grupos celulares y formas aisladas homologables a las formas bipolares, monopolares y multipolares (Figuras 47, 48).

La trama colágeno reticulínica puede ser escasa o abundante y disponerse en forma areolar, que es lo observado en los neuroblastomas nodulares.

Hasta aquí parecería todo claro, pero como se dijo en la introducción, los autores de mayor influencia como Bailey y Cushing introdujeron una nueva célula histogenética, en la necesidad de demostrar que esta célula era la que constituía estos blastomas indiferenciados. La llamaron meduloblasto y de allí el término meduloblastoma. ¿Por qué es esto?

La respuesta es que “al poner en práctica estas técnicas partieron de la suposición de que las células neoplásicas tenían reacción colorante análoga a las de las nerviosas y neuróglías normales, pero las imágenes obtenidas por ellos no siempre fueron satisfactorias. Un extenso grupo de blastomas formados por corpúsculos embrionarios se les mostró rebelde a la técnica y planteó a Bailey un serio problema de interpretación citológica” (Del Río Hortega) (55). Además dejaron de lado los estudios de Cajal y Del Río Hortega, que por otro lado, como se sabe, fueron con sus técnicas quienes describieron las estructuras de las cuatro líneas celulares del sistema nervioso central: neuronas, astrogliá, oligodendrogliá y microgliá.

Dicho meduloblasto nadie lo identificó y Del Río Hortega lo negó.

En este trabajo comparamos con las técnicas de IA y con las de inmunomarcación, cuyos resultados expresan que son neuroblastos.

En cuanto a las variantes de meduloblastoma en las nuevas clasificaciones ya mencionadas, no son más que formas histológicas de una misma lesión, no son formas distintivas clínicas, quirúrgicas o evolutivas.

Una mención especial es para el neuroblastoma con células rabdoideas, blastoma de rara presentación predominando en los retinoblastomas.

Siguiendo a Christos D. Katsetos y Mörk se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para Syn, GFAP y Ki67 (10, 11, 12).

Con las técnicas de inmunohistoquímica para Syn, que como vimos indica diferenciación neuronal, se tiñeron el 96,97 % los citoplasmas de las células neoplásicas de color pardo, y con diferentes intensidades. No se observó la imagen completa de la célula.

En los neuroblastomas nodulares/desmoplásicos se destacó la inmunomarcación en las zonas nodulares.

Reafirmando la diferenciación neuronal, Sotelo y col. en estudios experimentales, demostró que los precursores neuronales en el cerebelo del ratón postnatal (recién nacido), están totalmente diferenciados y no son multipotenciales. El fenotipo adulto está determinado por influencias extrínsecas durante o inmediatamente después de la última mitosis. (68)

Recientes estudios de Katsetos, Mörk y col. aportan nuevos conocimientos en el origen neuronal de estos tumores, a través de avances en la neurobiología. Según sus estudios la identidad clonal del fenotipo tumoral puede ser determinado por el carácter distintivo del neuroepitelio de origen.

Las características de diferenciación neuronal recapitulan al fenotipo neuronal ancestral, único en su neuropitelio de origen.

Según estos autores y otros como Rorque, el concepto de “tumor neuroectodérmico primitivo” (PNET), desdeña el significado de las “células de origen”, interpretando la existencia de patrones fenotípicos multidireccionales en una mezcla de neoplasias relacionadas (69,70).

Las células tumorales presentan características ultraestructurales de neuritas y expresan proteínas neuronales en una diferenciación que incluyen (71):

- Tubulina isotipo clase III (B III)
- Proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP 2)
- Proteína T
- Proteína Neurofilamento
- Sinaptofisina
- Proteína Neu.N
- Calbidina- D28

Según la visión de estos autores la diferenciación glial divergente debería ser tomada con precaución, su posición es que la proliferación astrocítica en los neuroblastomas son en su mayoría estromales o reactivos y podrían jugar el rol de interacción mutua célula a célula induciendo diferenciación neuronal-glial análogo a las células de Schwann no neoplásicas durante la maduración del neuroblastoma simpaticoadrenal (72, 73, 74, 75, 76. 77, 78, 79, 80).

En los neuroblastomas nodulares o desmoplásicos está comprobada su diferenciación neuronal marcada por la neuritogénesis neoplásica con evidencia de características ultraestructurales y además por la característica fenotípica de expresión para marcadores neuronales y por los receptores de neurotrofina (Trka y TRC) (71, 72, 73, 75, 77, 79, 81, 82, 83).

Según Katsetos, Mörk y col. cuatro fenotipos neuronales/neuroblásticos (Nb1-Nb4) reflejan gradaciones en el desarrollo neurítico, basado en patrones de coloración combinando Tubulina-BIII y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA/ciclina) (77) (Figura 57).

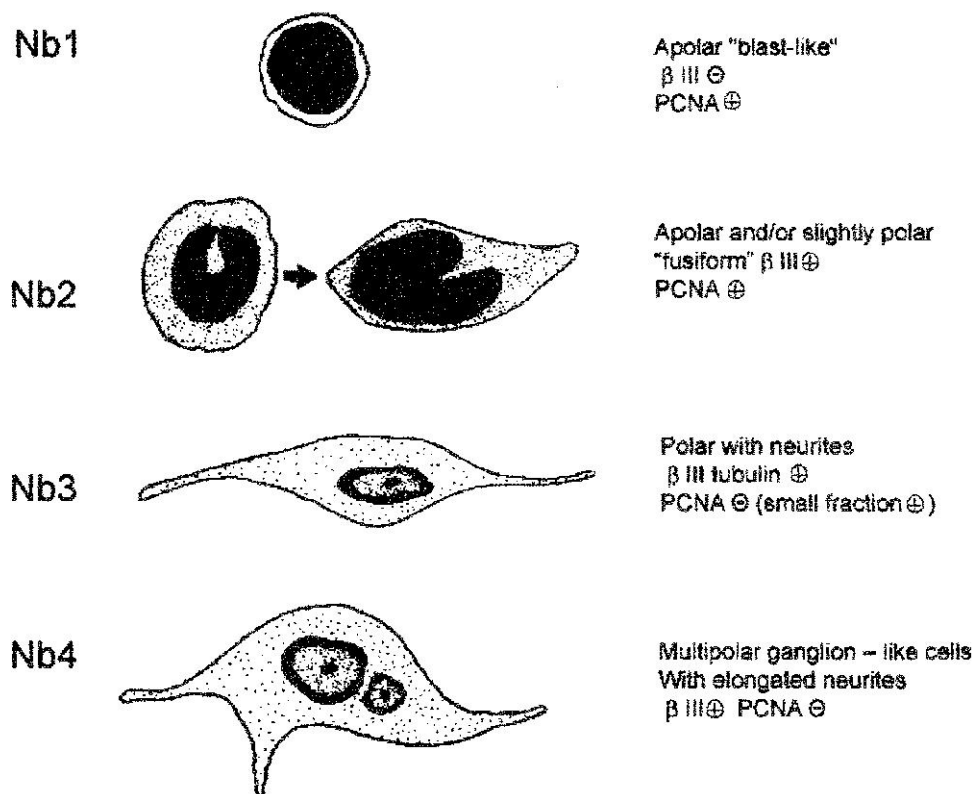


Figura 57: Representación esquemática de los cuatro fenotipos neuronales/neuroblásticos en el meduloblastoma, según la expresión de Tubulina B-III y PCNA/ciclina.

Extraído de la publicación Katsetos CD., Del Valle L., Legido A., Charadévian JP., Parentes E., Mörk SJ.; On the neuronal/neuroblastic nature of medulloblastomas: a tribute to Pío del Río Hortega and Moisés Polak; Acta Neuropathol; 105:6; 2003.

Según estos autores la diferenciación neuronal es más pronunciada en los llamados meduloblastomas nodulares/desmoplásicos.

Basados en la expresión de BIII y calbidina-D28, ellos sugirieron dos tipos de origen de este tumor, relacionado a neuroblastos progenitores del Velo Medular (VM) y de la Capa Granular Externa (CGE).

Concluyeron en que los del VM representarían la forma clásica de estos tumores llamados meduloblastomas clásicos y que los originados en la CGE originarían los meduloblastomas nodulares/desmoplásicos (Figura 58).

External granule layer	Velum medullare
Nodular/desmoplastic MBs	Subset of classic MBs
Subset of classic MBs	MBs w/ganglion cells
EGL-like phenotype β III ⁺ / p75 ^{NTR} ⁺ /Calb	VM-like phenotype β III ⁺ / p75 ^{NTR} ⁻ /Calb ⁺
	Glial differentiation (rare)

Figura 58: Hipótesis del origen dual del meduloblastoma (MB): Tubulina B-III (B III), calbidina -D28 k(Calb+), CGE, matriz ventricular del velo medular posterior (VM)
Extraída de la publicación Katsetos CD., Del Valle L., Legido A., Charadévian JP., Parentes E., Mörk SJ.; On the neuronal/neuroblastic nature of medulloblastomas: a tribute to Pío del Río Hortega and Moisés Polak; Acta Neuropathol; 105:6; 2003.

También describieron que los de tipo nodular/desmoplásico se observaron principalmente en adolescentes y adultos jóvenes.

Mientras que los de disposición clásica o difusos se observaron con más frecuencia en niños.

Según nuestros resultados, de manera significativa, podemos inferir que el patrón nodular predomina a mayor edad en sexo masculino a diferencia del sexo femenino en el que predomina el patrón difuso o clásico y en los primeros años de vida.

Todos los casos estudiados mostraron tinción para plata con la técnica de Doble impregnación argéntica.

Los resultados como se describieron demostraron que de los 33 casos estudiados el 96,97% fue positivo para Syn, en diversos grados de intensidad, siendo el 60,61% (n 20) de intensidad moderada ++/3+ y 36,36% (n 12) de intensidad fuerte +++/3+.

El 3,03% (n 1) fue negativo para este biomarcador, dado probablemente por el tiempo de fijación previa y el tipo de formol usado.

De manera significativa ($p < 0.05$) se observó en relación al uso de Syn para determinar el inmunofenotipo neuronal del neuroblastoma en comparación con las tinciones de plata realizadas, fueron ambas positivas. Syn positiva en el 96,97% (n 32) de los casos, y el 3,03% (n 1) fue negativa y tinción de plata positiva para todos los casos estudiados (n 33).

Con la técnica de GFAP las células neoplásicas no se colorearon, sólo fueron observadas focalmente en glia reactiva o remanente en las zonas de los islotes pálidos y en la periferia de los cortes, coincidiendo con las consideraciones de otros autores (71, 75, 78).

Con la marcación para Ki67 se observó un alto índice de proliferación celular en todos los tumores, mayor al 50%.

Cabe destacar y en coincidencia con otros autores (10, 73) que en la zona de los islotes pálidos o nódulos de los neuroblastomas desmoplásicos el Ki67 tuvo menor expresión.

La tinción con plata y la expresión de Syn, apoyan la teoría del inmunofenotipo neuronal del meduloblastoma. Coincidiendo con Del Rio Hortega.

Por lo expuesto la caracterización de las células tumorales se corresponden a las descritas por Del Río Hortega, Polak correspondientes a neuroblastomas, como también lo demostró con técnicas de inmunohistoquímica Christos D. Katsetos y otros autores.

En cuanto a la parte técnica la doble impregnación sólo impregna en el SNC neuronas y células derivadas de éstas, esto es corroborado ampliamente por todos los autores (10, 17).

Ambos métodos coincidieron en que obtuvimos imágenes semejantes de las células tumorales.

Siendo la técnica de la plata la mas recomendada para el estudio de estos tumores

IV-2 MODIFICACIÓN TÉCNICA

Realizamos modificaciones técnicas para rescatar los materiales incluidos en parafina, la cual se describe a continuación:

Básicamente los materiales procesados e incluidos en parafina los rescatamos para realizar técnicas de impregnación argéntica, que sólo podían realizarse en cortes por congelamiento.

Consistió en recoger los cortes en este caso de 10 micras en cápsula de petri, con benzol y/o xilol: para desparafinar y luego pasar por alcoholes descendentes 2 de 100 volúmenes, 1 de alcohol 96, 1 de alcohol 50 volúmenes y llevar los cortes a agua destilada que allí se distienden.

En esta cápsula se le agrega 4 gotas de amoníaco, se lo deja durante 4 horas y luego se procede como es habitual para las técnicas de impregnación argéntica en material de cortes por congelamiento.

Los resultados son adecuados como se demuestran en las microfotografías.

IV-3 ANÁLISIS DE LAS DISTINTAS CLASIFICACIONES

Actualmente, después de muchas controversias y debates, el meduloblastoma está bajo la denominación de Tumores Embrionarios en la última clasificación de la OMS de 2007 para tumores del SNC:

Tumores Embrionarios

Meduloblastoma

- Meduloblastoma Desmoplásico/Nodular

- Meduloblastoma con extensiva modularidad

- Meduloblastoma Anaplásico

- Meduloblastoma de Células grandes

Tumor Neuroectodérmico Primitivo del SNC

- Neuroblastoma del SNC

- Ganglioneuroblastoma del SNC

- Meduloepitelioma

- Ependimoblastoma

Tumor rabdoide/teratoide atípico

Los postulados de Del Río Hortega Polak continúan vigentes sobre el origen del llamado meduloblastoma informando que ellos ni otros investigadores han visto jamás un meduloblasto y que las células de este tumor presentan diferenciación neuronal, como lo apoyan estudios de Katsetos y por muchos autores en la actualidad (84, 85, 86, 87) demostrando un fenotipo de diferenciación neuronal con potenciales implicancias clínico biológicas.

A pesar de la aceptación por muchos autores como Burger, Frankfurt, Lopes Soffetti, Katsetos, Mörk (11, 84, 86, 87) que el meduloblastoma es de

naturaleza predominantemente neuronal, permanece en la clasificación de tumores del SNC bajo el término de “tumores embrionarios” junto con otros tumores de orígenes diversos y aberrantes como lo es el tumor rabdoide/teratoide atípico (85, 88, 89).

Nosotros apoyamos la sugerencia de Katsetos, Mörk y col. de que este tumor debería ser parte de un grupo de tumores neuronales /neuroblásticos basado en la clasificación de Del Rio Hortega, Polak y en la clasificación de trabajo de Russell y Rubinstein que en la primera edición (1959) y en las tres sucesivas (1963-1977) el meduloblastoma fue incluido en la categoría “Tumores de serie neuronal” junto con el neuroblastoma cerebral (1, 2, 90).

IV-4 CONCLUSIONES

1- El estudio comparativo de ambos métodos argénticos y de inmunohistoquímica fueron coincidentes en los hallazgos de la diferenciación neurofibrilar de los neuroblastomas, que con las técnicas argénticas pueden ser intracitoplasmáticas en bucles o expansivas de tipo axónico, generalmente unipolares. Las neurofibrillas se disponen cerca del núcleo o condensadas en la periferia, son onduladas y a veces rectilíneas con tendencia a formar prolongaciones axónicas.

2- Con las técnicas de inmunohistoquímica se evidenció el perfil inmunofenotípico empleando como anticuerpo la Syn, en todos los tumores confirmaba diferenciación neuronal.

3- Con las técnicas inmunohistoquímicas para GFAP, se evidenció tinción en la glía remanente no tumoral y evidenciado claramente en los neuroblastomas nodulares.

4- Con ambos métodos obtuvimos imágenes semejantes de las células neoplásicas, evidenciando su disposición difusa y/o en nódulos, sus prolongaciones citoplasmáticas y formación de rosetas.

5- Ambos métodos difieren en que con la impregnación argéntica se observan imágenes más completas de las células, las neurofibrillas se ven en el citoplasma y en las prolongaciones. Esto es debido a que se realizan cortes más gruesos entre 8 a 15 micras lo que permite una visualización casi tridimensional de la morfología de las células.

6- Con las técnicas de inmunohistoquímica se observó inmunofenotipo neuronal con tinción citoplasmática de diferentes intensidades y en distintos porcentajes sin poder evidenciar la morfología celular completa.

7- El índice de proliferación celular fue alto en todos los tumores estudiados.

8- Con ambos métodos hay coincidencias morfológicas.

9- Se propone una modificación técnica para reutilizar el material incluido en parafina con resultados positivos.

10- Sostenemos la validez de la Clasificación de Del Río Hortega-Polak por su interpretación del origen histogenético del neuroblastoma, precisión y sencillez.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFÍA

1. Del Río Hortega P: Estructura y sistematización de los gliomas y paragliomas. Arch Esp Oncol. 2:411-678. 1932.
2. Polak M: Blastomas del sistema nervioso central y periférico. Patología y ordenación histogenética. Buenos Aires. López Libreros Editores. 1966.
3. Bailey P, Cushing H: Medulloblastoma cerebelli: a common type of midcerebellar glioma of childhood. Arch Neurol Psychiatry. 14:192-223. 1925.
4. Kershman J: The medulloblast and the medulloblastoma: a study of human embryos. Arch Neurol Psychiatr. 40:937-967. 1938.
5. Russell DS, Rubinstein LJ: Pathology of tumours of the nervous system. 5th edition. London. Edward Arnold. 251-274. 1989.
6. Zülch KJ: Brain tumors. Their biology and pathology. 3rd edition. Berlin Heidelberg New York. 324-337. 1986.
7. Bailey P and Cushing H: A classification of tumors of the glioma group. Philadelphia. Lippincott. 1926.
8. Ramón y Cajal S: Manual de Histología Normal y de Técnica Micrográfica. 7^o edición. Madrid. Editorial Salvat. 1921.
9. Ramón y Cajal S: Recuerdos de mi vida: Historia de mi labor científica. 4^o edición. Madrid. Editorial Alianza. 1984.

10. Katsetos CD, Del Valle L, Legido A, Charadévian JP, Parentes E, Mörk SJ: On the neuronal/neuroblastic nature of medulloblastomas: a tribute to Pío del Río Hortega and Moisés Polak. *Acta Neuropathol.* 105:1-13. 2003.
11. Katsetos CD, Karkavelas G, Frankfurter A, Vlachos I, Vogeley K, Schober R, Wechsler W, Urich H: The stromal Schwann cell during maturation of peripheral neuroblastomas: immunohistochemical observations with antibodies to the neuronal class III B-tubulin isotype (BIII), and S-100 protein. *Clin Neuropathol.* 13: 171-180. 1994.
12. Katsetos CD, Legido A, Mörk SJ: Cáliz beta-tubulin isotype: a Key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol.* 18(12):851-66 discussion 867. 2003.
13. His W: Veber das Auftreten der weissen substanz und der Wurzelfasern am Rückenmark der menschlichen Embryonen. *Arch. F Anat Physiol.* 163-170, 1883.
14. Hardestey I: On the development and nature of the neuroglie. *Amer. Journ. Of Anat.* vol. 3. 1904.
15. Polak M, Azcoaga JE: *Neurohistología.* Buenos Aires. Editorial Eudeba. 1967.
16. Vaquero Crespo J: *Fundamentos de la Histología.* Primera edición. Madrid. Editorial Importecnica. 158. 1982.
17. Del Río Hortega P: El método del carbonato argéntico. Revisión general de sus técnicas y aplicaciones en histología normal y patológica. *Arch Hist y Pat* 2:231 y 577. 1943.

18. Stevenson L, Echlin F: Nature and origin of the some tumors of the cerebellum: Medulloblastoma. Arch. Neurol Psychiat. 31:93-109. 1934.
19. Schaper A: Die frühesten Differenzierungsgänge im ZNS. Arch Entwickl Mech Org. 5:81-130. 1897.
20. Penfield W: The classification of gliomas and neuroglial cell types. Arch Neurol Psychiatry. 26:745-753. 1931.
21. Miller D, Miller J: Embriología e histología. Buenos Aires. Editorial Aniceto López. 1932.
22. Del Río Hortega P: La microglia y su transformación en células en bastoncito y corpúsculos gránuloadiposos. Trab. Lab. Invest. Biol. 18, 37. 1920.
23. Garruto RM: Biological adaptability, plasticity, and disease: patterns in modernizing societies. In: Human Variability and Plasticity, CGN Mascie-Taylor and Barry Bogin, Eds Cambridge University Press. Cambridge. 190-212. 1995.
24. Schawartz JH: The cytology of neurons. In: Kandel ER, schawartz JH, Jessel TM eds. Principles of neurol science 3rd. Edition. Elsevier NY-Amsterdam_Tokyo. 1991.
25. Cruz Sánchez F: Neuropatología Diagnóstico y Clínica. 1^o Edición. Madrid. Editores Médicos S.A. 1-111. 2000.
26. Siegelbaum SA, Koester J. Ion channels. In: Kandel ER, Schawartz JH, Jessel TM eds. Principles of neurol science 3^o Edition. Elsevier NY-Amsterdam_Tokyo. 1991.

27. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.. *Biología molecular de la célula*. 3^o Edición. Ediciones Omega. 1996.
28. Schwartz JH: Synthesis and trafficking of neuronal proteins. In: Kandel ER, Schwartz JH, eds. *Principles of neuronal science* 3^o Edition. Elsevier NY-Amsterdam_Tokyo. 1991.
29. Farquhar MG, Palde GE: The Golgi Apparatus (Complex)-(1945-1981)-from artifact to Center Stage. *J Cell. Biol.* 91: 77s-103s. 1981.
30. Mourelatos Z, Yachnis A, Rorke L, Mikol J, Gonatas N: The Golgi Apparatus of Motor Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* 33: 608-615. 1993.
31. Stieber A, Mourelatos Z, Gonatas NK: In Alzheimer Disease the Golgi Apparatus of Population of Neurons without Neurofibrillary Tangles is Fragmented and Atrophic. *Amer J Pathol.* 148:415-426. 1996.
32. Mellman I, Simons K: The Golgi Complex: In Vitro Veritas. *Cell.* 68:829-40. 1992.
33. Gonatas NK: Contributions to the Physiology and Pathology of the Golgi Apparatus. *Amer J Pathol.* 145: 751-61. 1994.
34. Rothman JE, Orcil L.: Molecular Dissection of the secretory pathway. *Nature.* 355: 409-15. 1992.
35. Kornfeld S: Trafficking of lysosomal enzymes. *Faseb J.* 1:462-468. 1987.

36. Schawartz JH. Synaptic vesicles. In: Kandel ER, Schawartz JH, eds. Principles of neuronal science 3^o Edition. Elsevier NY-Amsterdam_Tokyo. 1991.
37. Moral A, Rossi ML Y cols: Synaptophysin in spinal anterior horn inaging and ALS: an immunohistological study. J Neural Transm. 103:1317-1329. 1996.
38. Anderson S, Bankier AT, Barrel BG. Y cols: Sequence and organization oh the human mitochondrial genome. Nature. 372: 55-63. 1981.
39. Hirano A: Neurons and Astrocytes. In Davis RL & Robertson DM.. eds.. textbook of Neuropathology . 2^o Edición. William & Wilkins. 1991.
40. Van Den Bosch H, Schutgens RBH, Wanders RJA, Tager JM: Biochemistry of peroxisomes. Annu Rev Biochem. 61: 157-197. 1992.
41. Wanders RJA, Heymans HAS, Schutgens RBH, Barth PG, Van Den Bosch H, Tager JM: Peroxisomal disorders in neurology. J Neurol Sci. 88: 1-39. 1988.
42. Cruz-Sánchez F: Antigenic determinants of neurofibrillary tangles relevance to progressive supranuclear palsy. J Neural Transm. 42: 165-178 (Suppl). 1994.
43. Trojanowski JQ, Lee VM-Y: Phosphorilation of paired helical filaments tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. Faseb J. 9: 1570-6. 1995.
44. Cheramy A, Leviel V, Glowinski J: Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. Nature. 289: 537-542. 1981.

45. Gerschenfeld HM, Wald T, Zadunaisky JA, DeRobertis EDP: Function of astroglia in the water-ion metabolism of the central nervous system. *Neurology*. 9:415-25. 1959.
46. Pope A: Neuroglia: quantitative aspects. In: Schoffeniels E, Franck G, Towers DB, Hertz L, eds. *Dynamic Properties of Glial Cells*. Oxford: Pergamon Press. 13-20. 1978.
47. Cajal SR: Sobre un Nuevo proceder de impregnación de la neuroglía y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y animales. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid*. 11: 219-37. 1913.
48. Palay SL, Chan-Palay V: *Cerebellar Cortex, cytology and organization*. New Cork: Springer-Verlag. 1974.
49. Robertson W: On a new method of obtaining a black reaction in certain-tissue elements of the central nervous system (platinum method). *Scott Med Surg J*. 4:23-30. 1899.
50. Del Río Hortega P: El tercer elemento de los centros nerviosos. *Bol Soc Esp Biol*. 9: 68-83. 1919.
51. Del Río Hortega P: Estudios sobre la neuroglía: la glía de escasas radiaciones (oligodendroglía). *Bol Real Soc Esp Hist Nat*. 21: 65-92. 1921.
52. Del Río Hortega P: Lo que debe entenderse por tercer elemento de los centros nerviosos. *Bol de la Soc Esp de Biol* . 11: 33-5. 1924.
53. Del Río Hortega P: El tercer elemento de los centros nerviosos. I.- La microglía en estado normal. *Bol de la Soc Esp de Biol*. 8: 68-82. 1920.

- 54.Theele DP, Streit WJ: A chronicle of microglial ontogeny. *Glia*. 7: 5-8. 1993.
- 55.Del Río Hortega P: Nomenclatura y clasificación de los tumores de sistema nervioso. 1º Edición. Buenos Aires. Editores López y Echegoyen. 7-63. 1945.
- 56.Rosai J. Surgical Pathology Rosai and Ackerman's. Tenth edition. Mosby Elsevier. Volume Two. 2377-2381. 2011.
- 57.Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A: Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res*. 14(4): 971-6. 2008.
- 58.Entz-Werlw N, Carli ED, Ducassou S, Legrain M, Dufour C: Medulloblastoma: What is the role molecular genetics?. *Expert Rev Anticancer Ther*. 8(7): 1169-81. 2008.
- 59.Michalany J: Técnica Histológica em Anatomía Patológica. Sao Paulo. Ed. Pedagóg. Univ. Ltda.. 1980.
- 60.Cejas H, Cejas A, Piva J: Introducción a las técnicas de Impregnación Argéntica. *Asoc Arg de Pat Cuaderno nº 1*, Santa Fé. 1981.
- 61.Cerril CR: Silverstaining of proteins and DNA. *Nature*. 343: 779. 1990.
- 62.Fialho A: Impregnacao argéntica nas investigacoes micológicas. *Arch. Hist. N. y Pat.. III Fasc.. 4:443-63*. 1947.

63. Tandler CJ, Pellegrino A: The effect of mercurio acetate post fixation on the silver-reducing property of proteins in situ. Comparison of the selectivity of staining in the pancreas and the striated muscle of adult rats. *Cumunic. Biol.* 10: 137-47. 1992.
64. Taylor C, Kledzik G: Immunohistologic techniques in surgical pathology: A spectrum of new special stains. *Human Pathology.* 12:590. 1981.
65. Battifora H, Kopinski M: The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. *J Histochem Cytochem.* 34:1095. 1986.
66. Chiu KY: Use of microwaves for rapid immunoperoxidase staining of paraffin section. *Med Lab Sci.* 44:3. 1987.
67. Dabbs DJ: *Diagnostic Immunohistochemistry, Theranostic and genomic applications.* third edition. Philadelphia. Saunders Elseviere. 6, 7, 8, 90, 167, 293, 808, 910. 2010.
68. Jankovski A, Rossi F, Sotelo C: Neuronal precursors in the postnatal mouse cerebellum are fully committed cells: evidence from heterochronic transplantations. *Eur J Neurosci* 8:2308-2319. 1996.
69. Rorke LB: The cerebellar medulloblastoma and its relationship to primitive neuroectodermal tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 42: 1-15. 1983.
70. Rorke LB: Experimental production of primitive neuroectodermal tumors and its relevance to human neuro-ocology. *Am J Pathol* 144: 444-448: 1994.

71. Katsetos CD, Liu HM, Zacks SI: Immunohistochemical and ultrastructural observations on Homer Wright (neuroblastic) rosettes and the "pale islands" of human cerebellar medulloblastomas. *Human Pathol* 19: 1219-1227. 1988.
72. Bühren L, Christoph AH, Bislei R, Albrecht S, Wiestler OD, Pietsch T: Expression of the neurotrophin receptor p75^{ntr} in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 229-240. 2000.
73. Eberhart CG, Kaufman WE, Tihan T, Burger PC: Apoptosis, neuronal maturation, and neurotrophin expression within medulloblastoma nodules. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 462-469. 2001.
74. Giordana MT, Caval P, Duto A, Borsotti L, Chio A, Schiffer D: Is medulloblastoma the same tumor in children and adults? *J Neurooncol* 35: 169-176. 1997.
75. Katsetos CD, Herman MM, Frankfurter A, Gass P, Collins VP, Walker CC, Rosenberg S, Barnard RO, Rubinstein LJ: Cerebellar desmoplastic medulloblastomas: a further immunohistochemical characterization of the reticulin-free pale islands. *Arch Pathol Lab Med* 113: 1019-1029. 1989.
76. Katsetos CD, Herman MM, Krishna L, Vender J, Vinoses S, Agamanolis DP, Schiffer d. Burger PC, Urich H: Calbindin-D28k in medulloblastoma subsets and in the human medolloblastoma cell line D283. *Med Arch Pathol Lab M* 119: 735-743. 1995.
77. Katsetos CD, Krisna L, Frankfurter A, Karkavelas G, Wolfe DE, Valsamis MP, Sciffer D, Vlachos I, Urich H: Cytomorphological scheme of differentiating

neuronal phenotypes in cerebellar medulloblastomas based on immunolocalization of class IIIB-tubulin isotype (BIII) and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin. Clin Neuropathol 14: 172-181. 1995.

78. Maraziotis T, Perentes E, Karamitopoulou E, Nakagawa Y, Gessaga EC, Probst A, Frankfurter A: Neuron associated class III B-Tubulin isotype, retinal S-antigen, synaptophysin and glial fibrillary acidic protein in human medulloblastomas: a clinicopathological analysis of 36 cases. Acta Neuropathol 84: 355-363. 1992.

79. WW, Lee VM, Packer RJ, Trojanowski JQ: Molecular markers of primitive neuroectodermal tumours and other pediatric central nervous system tumours. Lab Invest 61: 635-643. 1989.

80. Pelc K, Vincent S, Ruchoux MM, Kiss R, Pochet R, Sariban E, Decaestecker C, Heizmann CW: Calbindin-d28k. A marker of recurrence in medulloblastomas. Cancer 95: 410-419. 2002.

81. Burger PC, Grahmann FC, Bliestle A, Kleihues P: Differentiation in medulloblastoma. A histological and immunohistochemical study. Acta Neuropathol (Berl) 73: 115-123. 1987.

82. Herpers MJHM, Budka H: Primitive neuroectodermal tumours including the medulloblastoma: glial differentiation signaled by immunoreactivity for GFAP is restricted to the pure desmoplastic medulloblastoma ("arachnoidal sarcoma of the cerebellum") Clin Neuropathol 4: 12-18. 1985.

83. Muragaki Y, Chou TT, Kaplan DR, Trojanowski JQ, Lee VM: Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrKA receptors. J Neurosci 17: 530-542. 1997.

84. Burger PC, Grahmann FC, Bliestle A, Kleihues P: Tumors of the central nervous system. Atlas of tumor pathology. Third Series, Fascicle 10, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, pp 193-225. 1994.
85. Kleihues P, Cavenee WK: pathology and genetics tumours of the nervous system. IARC Press, Lyon. 2000.
86. Lantos PL, Kleihues P, Vandenberg SV, Lopes MBS: Tumours of the central nervous system. In: Graham DI, Lantos PL (eds) Greenfield's neuropathology. 6th edn. Arnold, London, pp 583-879. 1997.
87. Schiffer D, Giordana MT, Mauro A, Soffiatti R: Brain tumors. Pathology and its biological correlates. Springer Berlin Heidelberg New York, pp 241-260. 1993.
88. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifbenger G, Burger PC, Cavenee WK: The WHO Classification of tumors of the nervous system. J Neuropathol Exp Neurol 61: 215-225. 2002.
89. Katsetos CD, Frankfurter A, Christakos S, Mancall EL, Vlachos I, Urich H: Differential localization of class III B-tubulin (BIII) and calbindin-D28k defines distinct neuronal types in the developing human cerebellar cortex. J Neuropathol Exp Neurol 52: 655-666. 1993.
90. Russel DS., Rubinstein LJ: Pathology of tumours of the nervous system. 1st edition. London. Edward Arnold. 155-159. 1959.

ANEXO

Córdoba 17 de Diciembre de 2014

Certificación de Casos

Certifico que el siguiente listado de protocolos, corresponde a los pacientes que integran la muestra de estudio.

1	620-06	Hosp. Córdoba
2	13415	Hosp. Córdoba
3	16073	Hosp. Córdoba
4	16625	Hosp. Córdoba
5	C 481	Lab. Privado
6	13668	Hosp. Infantil
7	13740	Hosp. Infantil
8	14623	Hosp. Infantil
9	14675	Hosp. Infantil
10	15576	Hosp. Infantil
11	15833	Hosp. Infantil
12	17099	Hosp. Infantil
13	17380	Hosp. Infantil
14	561-09	Hosp. Niños
15	601-09	Hosp. Niños
16	741-09	Hosp. Niños
17	21831	Hosp. Córdoba
18	128-04	Hosp. Niños
19	16483	Hospital infantil
20	27945	Hosp. Córdoba
21	9404	Lab. Privado
22	13548	Lab. Privado
23	496-03	Hosp. Niños
24	1457-06	Hosp. Niños
25	1299-07	Hosp. Niños
26	263-08	Hosp. Niños
27	868-08	Hosp. Niños
28	313-09	Hosp. Niños
29	760-04	Hosp. Niños
30	643-03	Hosp. Niños
31	1328-02	Hosp. Niños
32	1243-09	Hosp Niños
33	1255-09	Hosp. Niños

[Signature]
DRA. VERONICA BENGIO
Jefa de Servicio de Anatomía Patológica
HOSPITAL CORDOBA

MVH

SERVICIO ANATOMIA PATOLOGICA
HOSPITAL CORDOBA

[Signature]
Dra. PATRICIA F. MORENO
ANATOMIA PATOLOGICA - CITOLOGIA
M.P. 19524 - M.E. 6153

ANATOMIA PATOLOGICA Dr. RUBEN HUGO BENGIO
HOSPITAL INFANTIL DIRECTOR
HOSPITAL CORDOBA



[Signature]
Dra. TERESITA FILI
ANATOMIA PATOLOGICA
M.P. 17182 - C.E. 4952



126



**Comité Institucional de Ética de la
Investigación en Salud
Hospital Córdoba**



Córdoba, 25 de Julio de 2007

Dra. Mónica Viviana Herrero
Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Córdoba.

Tengo el agrado de dirigirme a Ud. a fin de enviarle el informe de evaluación del plan de Trabajo de su Tesis Doctoral, luego de las correcciones solicitadas.

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: "ETUDIO MORFOLOGICO DE LOS NEUROBLASTOMAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. SU ORIGEN NEURONAL Y ESTUDIO CON TECNICAS ARGENTICAS E INMUNO HISTOQUIMICAS".

NOMBRE DE LA INSTITUCIÓN Y SEDE DE LA INVESTIGACIÓN: HOSPITAL CORDOBA, CORDOBA, ARGENTINA.

DECLARACIÓN DE LA DECISION TOMADA EVALUACION APROBADA.

EN EL CASO DE UNA DECISION POSITIVA EL INVENTIGADOR DEBERÁ:
ENTREGAR LOS REPORTES DE AVANCES
INFORMAR LA TERMINACIÓN DEL ESTUDIO.

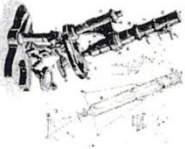
Sin otro motivo aprovecho para saludarla atte.



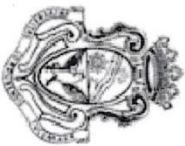
DR. NORCELO LIZIO
SUBDIRECTOR
HOSPITAL CORDOBA

DR. SALVADOR LIZIO
COORDINADOR - CIEIS
HOSPITAL CORDOBA

15/70 [Signature]



Universidad Nacional de Córdoba
Hospital Nacional de Clínicas
Facultad de Ciencias Médicas
1ª CÁTEDRA DE PATOLOGÍA



Vª JORNADA UNIVERSITARIA DE PATÓLOGOS DE CÓRDOBA

Por cuante: Herrero M.V., Cejas H.A., Rodríguez A., Bengio V, Moyano Crespo G.

Han participado en la presentación del trabajo: **NEUROBLASTOMAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL, SU ORIGEN NEURONAL SEGÚN LA CLASIFICACIÓN DE DEL RÍO HORTEGA. ESTUDIO CON TÉCNICAS ARGÉNTICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS**

Se otorga el presente CERTIFICADO

Córdoba 24 de abril de 2015

Prof. Dr. David Cremonozzi
Presidente Ejecutivo

Prof. Dra. María S. Furnes
Presidente Ejecutivo

Prof. Dra. M. Elisa D. de Caballer
Presidente Ejecutivo