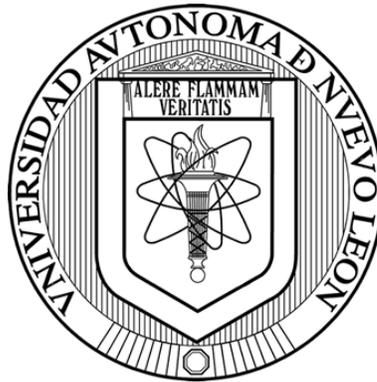


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA Y ULTRAESTRUCTURAL
DEL EFECTO INDUCIDO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO POR LAS
CÉLULAS TC-1 IMPLANTADAS EN RATONES C57BL/6.**

Por

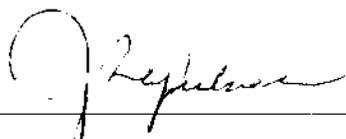
BIOL. JAVIER IVÁN VÁZQUEZ MORALES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN TERMINAL EN MORFOLOGÍA**

Diciembre del 2011

**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA Y ULTRAESTRUCTURAL
DEL EFECTO INDUCIDO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO POR LAS
CÉLULAS TC-1 IMPLANTADAS EN RATONES C57BL/6**

Aprobación de la Tesis:



M.C.P. y Ph. D. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA

Director de Tesis



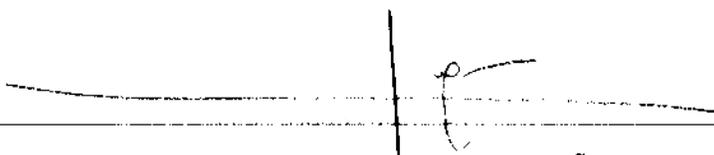
Ing. B., M.C. y Dr. C. ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ

Co-director de Tesis



Biol. y M.C. VIKTOR JAVIER ROMERO DÍAZ

Co-director de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA Y ULTRAESTRUCTURAL
DEL EFECTO INDUCIDO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO POR LAS
CÉLULAS TC-1 IMPLANTADAS EN RATONES C57BL/6**

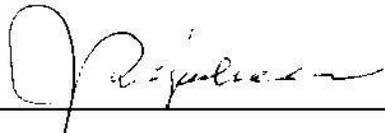
Presentado por:

Biól. Javier Iván Vázquez Morales

Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección del Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra y la co-dirección del Dr. Adolfo Soto Domínguez y el M.C. Viktor Javier Romero Díaz.

FIRMAS

Director de Tesis



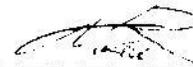
M.C.P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra

Co-Director de Tesis



**Ing. B., M.C. y Dr. C. Adolfo Soto
Domínguez**

Co-Director de Tesis



**Biól. y M.C. Viktor Javier Romero
Díaz**

TABLA DE CONTENIDO	Pág.
CAPÍTULO	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	2
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	9
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	10
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3. RESULTADOS.....	15
3.1 Evaluación histológica.....	
3.2 Histoquímica.....	16
3.3 Inmunohistoquímica.....	
3.4 Morfometría.....	17
3.5 Evaluación ultraestructural.....	25
4. DISCUSIÓN.....	32
5. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	38
5.1 Conclusión.....	
5.2 Perspectivas.....	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
APÉNDICE A.....	43
APÉNDICE B.....	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAG.
1. Diagrama que ilustra la estrategia experimental.....	14
2. Hallazgos con el método tricrómico de Masson.....	20
2A. Imagen del grupo control.....	
2B. Infiltración de la masa tumoral y tinción heterogénea de las fibras musculares...	
2C. Disminución de tamaño de las fibras musculares y presencia de núcleos centrales.....	
2D. Células TC-1 en el interior de una fibra muscular.....	
2E. Afectación a las fibras musculares, vista en sentido longitudinal.....	
2F. Cambios tintoriales en las fibras musculares.....	
3. Hallazgos con la técnica de PAS con diastasa.....	22
3A. Aspecto de la lámina externa en el grupo control.....	
3B. Material amorfo PAS positivo.....	
3C. Invasión con destrucción de una fibra muscular y fragmentación de la lámina externa.....	
3D. Células con citoplasma PAS positivo que invaden una fibra muscular.....	
4. Hallazgos inmunohistoquímicos.....	24
4A. Área de infiltración con marcaje para células tumorales.....	
4B. Área de infiltración con marcaje para fibras musculares.....	
4C. Células TC-1 marcadas dentro de una fibra muscular.....	
4D. Células TC-1 dentro de una fibra muscular con marcaje.....	
5. Hallazgos ultraestructurales.....	28
5A. Invasión tumoral.....	
5B. Pseudópodos de las células tumorales.....	
5C. Alteraciones de la lámina externa.....	
6. Hallazgos ultraestructurales.....	30
6A. Discontinuidad del sarcolema y lámina externa.....	
6B. Interrupción del sarcolema y vesículas subsarcolemales.....	
6C. Células tumorales dentro de una fibra muscular.....	

7. Otros hallazgos ultraestructurales.....	31
7A. Vesículas y mitocondrias vistas en el medio extracelular.....	
7B. Acúmulos de mitocondrias de la fibra muscular.....	

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA	PAG.
1. Histograma de las áreas transversales de fibras musculares del grupo control y del grupo implantado con células TC-1.....	18

APÉNDICE A

A. TÉCNICAS Y MÉTODOS	PAG.
A.1 Técnica histológica.....	43
A.2. Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (H & E).....	44
A.3. Técnica de tinción con el método tricrómico de Masson.....	45
A.4. Técnica histoquímica de Ácido Peryódico de Schiff (PAS) con diastasa.....	46
A.5. Método inmunohistoquímico para actina y citoqueratinas.....	47
A.5.1 Cubierta de portaobjetos con solución adhesiva de Poli-L-lisina.....	48
A.6. Técnica de preparación de muestras para microscopia electrónica de transmisión.....	49

APÉNDICE B

SOLUCIONES Y REACTIVOS	PAG.
B. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS:	
B.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO	
B.1.1 Solución acuosa de formalina.....	50
B.1.1.1 Solución amortiguada de formalina.....	
B.1.2 PBS 10 X.....	
B.1.2.1 PBS 1X.....	51
B.1.3 Solución fijadora de Karnovsky- Ito.....	
B.1.4 Glutaraldehído al 2.5 %.....	
B.1.5 Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4.....	
B.1.6 Tetraóxido de osmio 2 %.....	52
B.1.7 Nitrato de uranilo 1%.....	
B.1.8 Resina epóxica.....	
B.1.9 Azul de toluidina 5 %.....	
B.1.10 Acetato de uranilo 5 %.....	53
B.1.11 Citrato de plomo 0.4%.....	
B.1.12 Hematoxilina de Gill.....	
B.1.13 Eosina.....	54
B.1.14 Solución de alcohol-ácido.....	
B.1.15 Solución de agua amoniacal.....	
B.1.16 Hematoxilina férrica de Weigert.....	
B.1.16 .1 Solución de cloruro férrico al 29%.....	55
B.1.17 Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich.....	
B.1.17.1 Solución de escarlata de Biebrich.....	

B.1.17.2 Solución de fucsina ácida.....	
B.1.18 Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.....	
B.1.19 Solución de azul de anilina.....	56
B.1.20 Solución acuosa de ácido acético al 1%.....	
B.1.21 Solución fijadora de Bouin.....	
B.1.22 Solución enjuagadura sulfurosa.....	
B.1.22.1 Solución de metabisulfito de sodio 10 %.....	

B.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

B.2.1 Solución de trabajo de Poli-L-lisina.....	57
B.2.2 Solución de Tween 20-tris-amortiguador salino (TBST).....	
B.2.3 Solución recuperadora de antígenos (TRS).....	
B.2.4 Solución de sustrato-cromógeno.....	

ABREVIATURAS

5×10^4	50,000
%	Porcentaje
™	Marca registrada
®	Marca registrada
céls.	Células
cols.	Colaboradores
DDSA	Dodecenil anhídrido succínico
DMP 30	[2,4,6-Tris dimetilaminometil] fenol
E6	Proteína viral 6 del VPH
E7	Proteína viral 7 del VPH
Fig.	Figura
g	Gramo
HPV	Virus del Papiloma Humano
HPV-16	Virus del Papiloma Humano tipo 16
hr.	Hora
H & E	Hematoxilina y eosina
HCl	Ácido clorhídrico
IHQ	Inmunohistoquímica
KCl	Cloruro de potasio
KH_2PO_4	Fosfato ácido de potasio
M	Molar
ME	Músculo esquelético
min.	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mm ²	Milímetro cuadrado
N	Normal
n	Número de datos
NaCl	Cloruro de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato ácido de sodio
nm	Nanómetro
NMA	Anhídrido metil-biciclo(2.2.1) hepta-5-ene-2,3-dicarboxílico.
PAS	Ácido Peryódico de Schiff
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
SD	Desviación estándar
Sig. Asint. Bil.	Significancia Asintótica Bilateral
TA	Temperatura Ambiente
TBS	Tris- Amortiguador Salino
TBST	Tween 20 – Tris – Amortiguador Salino
TRS	Solución Recuperadora de Antígenos
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
α	Significancia estadística
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μm ²	Micrómetro cuadrado

RESUMEN

JAVIER IVÁN VÁZQUEZ MORALES

Fecha de Graduación: Diciembre del 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Facultad de Medicina.

Título: EVALUACIÓN HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA Y ULTRAESTRUCTURAL DEL EFECTO INDUCIDO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO POR LAS CÉLULAS TC-1 IMPLANTADAS EN RATONES C57BL/6.

Número de páginas:

57

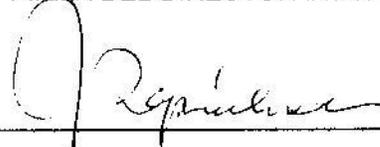
Área de estudio: Morfología

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con orientación terminal en Morfología.

Propósito y Método del estudio: La línea celular tumoral TC-1 se ha utilizado en la evaluación de inmunoterapia antitumoral. No hay reportes sobre el tipo de interacción de las células TC-1 con el músculo esquelético adyacente que indiquen su grado de malignidad, ya que ésta es mayor cuando los cánceres invaden el interior de las fibras musculares y tienen mayor resistencia a los tratamientos. La invasión al músculo esquelético es un evento poco frecuente, pues solo se ha reportado un 0.8% de casos de metástasis a este tejido. Se han descrito, tanto en humanos como en modelos animales, tres formas de interacción de las células cancerosas con el músculo esquelético adyacente: A) infiltración entre el perimisio y el endomisio; es la más común, B) infiltración entre la lámina externa y el sarcolema o, C) invasión al interior de las fibras musculares, con la formación de agregados de células tumorales en el sarcoplasma; es la más rara y de peor pronóstico. El objetivo de este trabajo es evaluar por métodos morfológicos el efecto en las fibras musculares esqueléticas adyacentes inducido por las células TC-1 implantadas y su posible interacción, en el modelo de ratón C57BL/6. Para lograrlo se utilizaron 8 ratones C57BL/6 de 4-6 semanas de edad que recibieron un implante subcutáneo de células TC-1, y 3 ratones sin implante que fueron el grupo control. Se obtuvieron muestras del sitio de implante, 10 días después. Se describió la histología mediante la tinción de H & E y la técnica de tricrómico de Masson. La lámina externa se demostró aplicando la técnica de PAS con diastasa. Para identificar al músculo esquelético y a las céls. TC-1, se efectuó un marcaje inmunohistoquímico, empleando anticuerpos contra actina específica para ME, y citoqueratinas AE1 y AE3, respectivamente. Se determinó y comparó estadísticamente el grosor de las fibras musculares afectadas vs. los valores del grupo control. Por último se realizó el análisis ultraestructural mediante imágenes obtenidas del microscopio electrónico de transmisión.

Conclusiones y Perspectivas: De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que las células TC-1 son células tumorales altamente invasivas y por lo tanto con un grado importante de malignidad, como se ha descrito para las células tumorales que invaden al músculo esquelético. Estos hallazgos deben tenerse en cuenta cuando se utiliza este modelo para valorar la respuesta de tratamientos antitumorales. Se propone identificar la presencia de proteasas secretadas por las células TC-1 y realizar una evaluación similar a la de este modelo en animales sometidos a tratamientos antitumorales.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



M.C.P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La línea celular tumoral TC-1 fue desarrollada por Lin y cols. (1996)¹ a partir de un cultivo primario de células epiteliales de pulmón de ratón C57BL/6, que fueron co-transformadas para expresar las proteínas E6 y E7 del HPV-16 e inmortalizadas con el oncogén c-Ha-ras. Cuando se implantan estas células, en la cepa de ratones C57BL/6, no se produce rechazo inmunológico, ya que se originaron en esta misma cepa de ratones. Las células tumorales TC-1, han sido extensamente utilizadas en estudios sobre la evaluación de la inmunoterapia dirigida contra tumores inducidos por HPV, cuyas células expresan en su membrana antígenos virales.^{2,3} Hasta la fecha, no se ha reportado en la literatura, la interacción que establece esta línea celular con el tejido muscular esquelético adyacente, al ser implantada.

El músculo esquelético (ME) está formado por células cilíndricas y multinucleadas, con los núcleos hacia la periferia, llamadas fibras musculares. Contienen miofibrillas, que están formadas a su vez por un conjunto de miofilamentos contráctiles, cuyo arreglo les da la apariencia estriada a las fibras musculares esqueléticas. Las fibras musculares están delimitadas por la membrana celular llamada sarcolema, que a su vez está envuelta en una capa de matriz extracelular que forma la lámina externa. La lámina externa está formada por polisacáridos complejos, y en imágenes ultraestructurales muestra una lámina lúcida y una lámina densa.

Cada fibra muscular está rodeada por el endomisio, que es una vaina de tejido conectivo compuesta de fibras reticulares. El perimisio, un tejido conectivo poco denso y colagenoso, rodea a los haces o fascículos de fibras musculares. A su vez, el epimisio, un tejido conectivo denso irregular y colagenoso, cubre grupos variables de haces musculares, que integran un músculo estriado.^{4,5,6}

1.1 ANTECEDENTES

El cáncer afecta al ME de varias maneras. En pacientes causa caquexia, que se caracteriza por una importante y progresiva pérdida de masa corporal, atribuible principalmente a una disminución de la masa muscular.⁷ Los tumores metastásicos en ME, son un hallazgo poco frecuente y en la práctica clínica han sido reportados con una baja frecuencia,^{8,9,10,11,12} pues se ha reportado que solo representan 0.8% de los casos de metástasis, a pesar de que el ME tiene un abundante riego sanguíneo y ocupa alrededor del 50% de masa corporal.^{8,12,13,14,15,16,17} En los casos en que se presenta, la metástasis a ME se ha asociado con un mal pronóstico, que se traduce en una menor esperanza de vida para el paciente.^{8,9,13,14,15,16,18,19}

La razón para explicar la baja frecuencia de las metástasis a ME no está clara, pero se ha relacionado con factores como: temperatura local, movimiento constante, producción de ácido láctico, flujo y presión sanguínea variables, cambios de pH y oxigenación, presencia de leucocitos, alta presión tisular, así como la presencia de proteasas y de factores peptídicos inhibitorios del crecimiento tumoral.^{8,12,13,14,15,18,19}

Existen estudios histopatológicos de pacientes con metástasis a ME que reportan la invasión de las células tumorales hacia el interior de las fibras musculares. Slatkin y Pearson (1976),²⁰ reportan el caso de un paciente muerto a consecuencia de un carcinoma metastásico bronquial de células pequeñas, en cuyo análisis se observaron “neoplasmas intramiofibrilares,” y se encontró un mayor número de células tumorales dentro de las fibras musculares que en el endomisio. Stratton y cols. (1982),²¹ estudiaron la invasión a ME en muestras de pacientes con sarcoma de Ewing de hueso. Se observaron fibras musculares dilatadas que contenían células tumorales aparentemente viables, rodeadas por sarcoplasma y con sarcolema aparentemente intacto. Hubo una menor tasa de supervivencia en los pacientes que mostraron este tipo de invasión, y los autores proponen que los tumores que ocasionan invasión dentro de las fibras musculares son más agresivos que aquellos que no presentan este fenómeno.

Se han efectuado estudios experimentales en modelos animales sobre la relación entre células tumorales y el tejido muscular esquelético.

Brandes y cols. (1967),²² realizaron el primer estudio de este tipo y efectuaron un análisis histoquímico (para identificar lisosomas) y ultraestructural en ME y músculo liso. Este equipo de investigadores implantó células de leucemia L1210 en dos grupos de ratones DBA/2; uno recibió un implante intramuscular, mientras que el otro grupo recibió un implante intraperitoneal. Los animales se sacrificaron entre el día 5 y 6 post-implante. En el ME se observaron células neoplásicas infiltrando y ensanchando los espacios entre las fibras musculares. También se observó un aumento en la actividad micropinocítica con vesículas de baja electrodensidad y la aparición de áreas, que denominaron hiperplasia marginal del sarcoplasma. Estas áreas contenían cuerpos de mielina, abundantes ribosomas, aparato de Golgi y mitocondrias hiperplásicas. En las mitocondrias se detectaron cambios degenerativos; las crestas perdieron su nitidez y hubo presencia de bandas de material amorfo. Conforme progresó la invasión, se observó desaparición del sarcolema, y las miofibrillas comenzaron a desintegrarse; las fibras musculares aparecieron delgadas e irregulares y mostraron áreas de constricción, que parecen provocar su fragmentación y desintegración. Este trabajo reportó ultraestructuralmente que la degeneración de las células tumorales estaba en relación con la degeneración posterior de las fibras musculares.

Galasko y Muckle (1974),²³ realizaron una evaluación de la invasión de las células de carcinoma VX2 al ME.

Para efectuar el estudio inyectaron dichas células en conejos; el análisis se llevó a cabo a partir de la muerte de los animales empleando tanto el microscopio óptico como el electrónico de transmisión: Los autores reportaron que las células tumorales invadían al ME de varias maneras. Primero, encontraron invasión al tejido fibroso. Luego, se encontraron áreas de infiltración entre las fibras musculares con atrofia de éstas. Pero el modo mas interesante de invasión ocurrió cuando se observaron células por dentro del sarcolema, situadas en el sarcoplasma de las fibras musculares, formando nidos de células tumorales.

Carr y cols. (1975),²⁴ realizaron un análisis sobre la invasión del tumor de rata Rd/3 después de ser inyectado en la pared abdominal, en la vena porta y en la almohadilla plantar de la extremidad posterior. Emplearon células del tumor anaplásico de rata Rd/3. Éstas fueron inyectadas en tres grupos; un grupo recibió el implante en la vena porta y fueron sacrificados entre 1 y 6 días después para evaluar la metástasis a hígado. El segundo grupo recibió el implante en la pared abdominal anterior a la fascia muscular y fueron sacrificados entre 1 y 5 días después, con objeto de evaluar un sitio donde la metástasis linfática no ocurre fácilmente. El tercer grupo fue implantado en la almohadilla plantar y sacrificado de 2 a 7 días post-implante, para evaluar la metástasis por vía linfática. Se analizaron las muestras en días consecutivos para describir la progresión de la invasión. En el sitio de implante de la pared abdominal se presentó un grado variable de separación de los haces musculares por edema.

Las células tumorales presentaban numerosos procesos citoplásmicos digitiformes y aparecieron adosadas a las fibras musculares, aparentemente comprimiéndolas. Conforme el proceso invasivo continuó, se observaron grupos de células tumorales invadiendo las fibras musculares; numerosos procesos citoplásmicos de las células Rd/3 estaban estrechamente asociados a los miofilamentos y parecían comprimirlos y separarlos.

Babaï (1976),²⁵ describió los aspectos ultraestructurales de la invasión del ME empleando tres tumores transplantables, en un modelo de ratas. Se transplantaron fragmentos de 1 mm³ de cada tipo de tumor en la pata posterior de los animales en el siguiente orden: hepatoma de Novikoff en ratas Sprague-Dawley, tumor de Walker en ratas Wistar, y rhabdomiosarcoma N.S. 104 en ratas Fisher. Las ratas fueron sacrificadas entre 10 y 15 días después del trasplante. En los tres casos se encontró que la lámina externa de las fibras musculares estaba discontinua o ausente. A través de las zonas donde la lámina externa estaba discontinua se infiltraron prolongaciones citoplásmicas, o incluso células tumorales completas. En este caso la fibra muscular luce comprimida por las células tumorales, que se sitúan entre la lámina externa y el sarcolema. Las fibras musculares peritumorales presentaron hinchazón de mitocondrias, desorganización de miofilamentos, disminución o desaparición del glucógeno, y necrosis en fibras no infiltradas. En una fase más avanzada de la invasión tumoral, se encuentran sitios de disolución del sarcolema con liberación de organelos y signos de degeneración de la fibra muscular.

El autor distingue varias etapas de la invasión, que en orden son: infiltración intercelular, disolución localizada de la lámina externa, infiltración transcelular, y finalmente destrucción de las fibras musculares invadidas. También hace notar que la infiltración transcelular no es una invasión intrasarcoplásmica, ya que el sarcolema se encuentra conservado al momento de la invasión, y su destrucción al final se acompaña de fragmentación y de liberación de los organelos. Sus observaciones muestran la invasión y destrucción de fibras musculares en contacto con células tumorales activas y no necróticas.

En 1987, Gabbert y cols.²⁶ estudiaron por microscopía óptica y electrónica la interacción entre células tumorales invasoras y el tejido huésped, empleando carcinomas y sarcomas inducidos experimentalmente e injertados en ME. Se utilizaron las células DMH-Co-1 de adenocarcinoma murino de colon que fueron implantadas en un grupo de ratones NMRI *nu/nu* y las células BA-HAN-1 de sarcoma murino de tejidos blandos, que fueron a su vez implantadas en ratas Lewis Hannover. En ambos casos las células fueron inyectadas por vía subcutánea en el muslo. Los tumores fueron removidos cuando tuvieron entre 5 y 10 mm de diámetro. Los resultados con ambos grupos fueron similares. Se encontraron zonas con espacios intersticiales agrandados y las células tumorales presentaron escaso o nulo contacto con las fibras musculares. En otras zonas se encontró atrofia y pérdida de la arquitectura de las fibras musculares, y algunas de éstas presentaron filas de núcleos centrales.

A microscopía electrónica, se encontró pérdida focal de la lámina externa, desplazamiento de las sarcómeras con pérdida de su estructura y orientación, bandas Z zigzagueantes y presencia de espacios entre las miofibrillas. Se observaron células tumorales que invaginaban las fibras musculares, dando la apariencia de las fibras musculares rodeando grupos de células tumorales. También se observaron algunas fibras musculares necróticas y sus remanentes, que coexisten con fibras con pocas alteraciones. Uno de los hallazgos de los autores fue la pérdida focal de la lámina externa en áreas de contacto con células tumorales.

De acuerdo con los reportes mencionados, tanto en modelos animales experimentales como en reportes histopatológicos en pacientes, se pueden distinguir tres formas histológicas de interacción entre células cancerosas y el ME. La infiltración es la más común y es la penetración de las células tumorales hacia el espacio entre las fibras del ME, donde se pueden apreciar las células cancerosas rodeando a las fibras musculares.^{22,26,27} Existe otra forma de interacción, donde proyecciones del citoplasma de las células tumorales pasan a través de una interrupción en la lámina externa y se sitúan entre ésta y el sarcolema, que permanece intacto.²⁵ Una tercer forma de interacción, que es la mas rara, es la invasión de las células cancerosas a las fibras musculares, con la aparición de agregados de células tumorales en el sarcoplasma. Aún no se ha establecido como es que las células tumorales se sitúan en el interior de las fibras musculares.^{20,21,23,24}

Es importante mencionar que en los tres tipos de interacción se observan cambios degenerativos en las fibras musculares. Estos cambios incluyen atrofia progresiva que incluye pérdida de miofilamentos, compresión y fragmentación del sarcoplasma hasta su desaparición total, así como un reemplazo progresivo por parte de las células tumorales.

Hasta la fecha, no se ha reportado la posible interacción que la línea celular tumoral TC-1 establece con el músculo esquelético adyacente.

1.2 JUSTIFICACIÓN

No hay en la literatura reportes a la fecha sobre la interacción de las células tumorales TC1 implantadas por vía subcutánea y el tejido muscular esquelético adyacente.

El tipo de interacción de las células tumorales con las fibras musculares es indicativo del grado de malignidad de las células tumorales.

Por lo anterior consideramos importante evaluar mediante métodos histológicos, histoquímicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales las posibles alteraciones inducidas en el ME por el implante de células TC-1 en ratones C57BL/6.

1.3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar por métodos morfológicos el efecto de la implantación de células TC-1 en el tejido muscular esquelético adyacente y su posible interacción, en el modelo de ratón C57BL/6.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I.- Describir la histología de las fibras musculares esqueléticas adyacentes a las células TC-1 implantadas y compararla con la de fibras musculares del grupo control en el ratón de la cepa C57BL/6.

II.- Identificar y describir los hallazgos histoquímicos e inmunohistoquímicos de muestras de ME del sitio de implante de células TC-1 y compararlos con el grupo control sin implante de células TC-1 en el ratón de la cepa C57BL/6.

III.- Realizar un estudio morfométrico comparativo, mediante un análisis estadístico, del grosor de las fibras musculares esqueléticas adyacentes a las células TC-1 implantadas con el grosor de las fibras musculares del grupo control sin implante de células TC-1, en el ratón de la cepa C57BL/6.

IV.- Evaluar la ultraestructura de las fibras musculares presentes en el sitio de implante de células TC-1 y compararla con muestras del grupo control sin implante de células TC-1 en el ratón de la cepa C57BL/6.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

Las células tumorales TC-1 se cultivaron, cosecharon y cuantificaron de acuerdo con procedimientos ya establecidos en el Depto. de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL.²⁸ Las células se suspendieron en PBS y se implantaron, previo examen de viabilidad con azul de tripano, en una concentración de 5×10^4 células/100 μ L en la extremidad posterior derecha de 8 ratones C57BL/6, por vía subcutánea. Otro grupo de 3 ratones, que no recibieron el implante celular, constituyeron el grupo control.

Para los fines mencionados se emplearon ratones de la cepa C57BL/6 de 5-6 semanas de edad y que tuvieran un peso de 25 a 30 gramos (Harlan México, UNAM). Los ratones fueron mantenidos con una dieta estándar de laboratorio con agua *ad libitum* y ciclo de luz y oscuridad de 12 horas en el Bioterio del Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UANL.

Los ratones fueron sacrificados a los 10 días posteriores al implante, por dislocación cervical y perfundidos por punción en el ventrículo izquierdo, primero con solución salina y luego con glutaraldehído al 2.5 % en buffer de cacodilatos pH 7.2-7.4. Una vez perfundidos se colectaron los sitios del implante de la extremidad posterior derecha.

Una parte de la muestra colectada fue fijada por inmersión en formalina, y se procesó por la técnica histológica hasta incluirla en parafina y formar bloques (Apéndice A.1). A partir de los bloques se obtuvieron cortes de 5 y 6 μm que fueron teñidos con las técnicas de H & E (Apéndice A.2), y el método tricrómico de Masson (Apéndice A.3). Se efectuó un examen preliminar de las muestras con los cortes teñidos con H & E para identificar las áreas de interés en cada bloque antes de realizar los cortes para el método tricrómico de Masson, el PAS con diastasa y la IHQ.

Para la evaluación histoquímica se obtuvieron cortes de 4 μm , obtenidos de los bloques de parafina del sitio del implante, y fueron teñidos con el método del Ácido Peryódico de Schiff (PAS) modificado con diastasa (Apéndice A.4). Este método permite identificar los polisacáridos complejos de la lámina externa.

Para efectuar los métodos inmunohistoquímicos (Apéndice A.5) se obtuvieron cortes de 4 μm para identificar las células TC-1 con anticuerpos primarios contra citoqueratinas AE1 y AE3, que son proteínas que forman los filamentos intermedios en las células epiteliales. Para identificar las fibras musculares se emplearon anticuerpos contra actina específica para ME, que es una proteína que forma parte de los miofilamentos contráctiles. Para ambos ensayos se utilizó el sistema de detección Envision™ (Dako®).

Para el análisis morfométrico se observaron los cortes teñidos por el método tricrómico de Masson y se identificaron las fibras musculares en corte transversal, tanto de muestras del grupo implantado como del experimental. Se efectuó un muestreo aleatorio al medir las áreas de las secciones transversales de 200 fibras musculares por cada individuo (n=11) en micras cuadradas (μm^2), con ayuda del analizador de imagen y el software NIS elements versión 2.30. A partir de los datos de las áreas se calcularon la media y la desviación estándar de cada individuo, posteriormente se compararon los resultados del grupo implantado con los del grupo control mediante una prueba de medias para muestras independientes con el software SPSS 15.0.

De forma paralela, la otra parte de cada una de las muestras colectadas de los sitios de implante, fue fijada por inmersión en solución de Karnovsky-Ito, postfijada en tetraóxido de osmio y se procesó hasta incluirse en bloques de resina epóxica, de los cuales se obtuvieron cortes semifinos, que fueron contrastados con azul de toluidina y se analizaron con el microscopio óptico para identificar áreas de interés. A partir de dichas áreas se obtuvieron cortes finos, que fueron contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo para la evaluación ultraestructural con el microscopio electrónico de transmisión (Apéndice A.6). En la figura I se puede apreciar un esquema sobre la estrategia experimental.

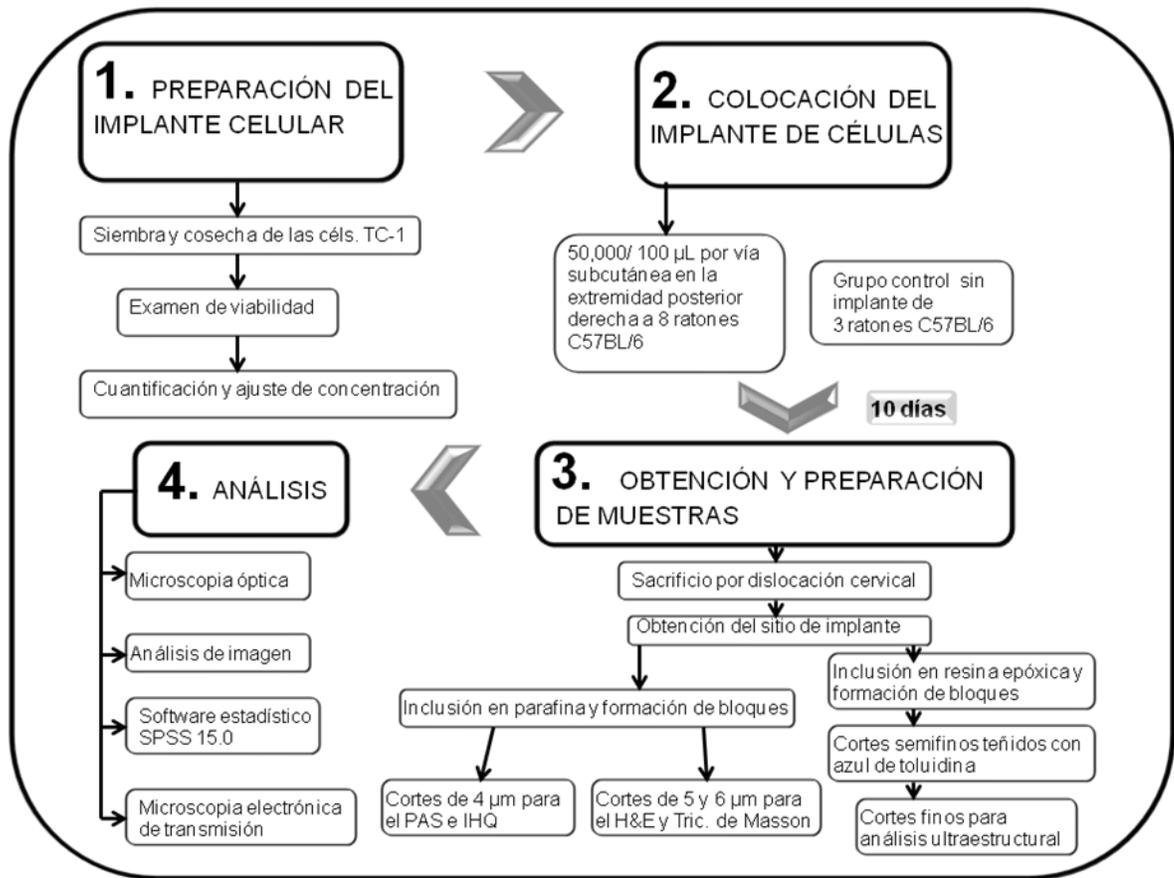


Figura I. Diagrama que ilustra la estrategia experimental.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

A 10 días posteriores al implante de células TC-1 en el tejido celular subcutáneo de la extremidad posterior del ratón, se observaron células tumorales TC-1 que infiltraban el tejido subcutáneo y el ME, tanto al perimysio como al endomysio. En dichas áreas de infiltración, se observaron células tumorales en el endomysio y en contacto directo con las fibras musculares, que se observaban separadas entre sí (Fig. 2B). También se apreciaron, en cortes tanto transversales como longitudinales, variaciones en el tamaño de las fibras musculares, alteraciones en la intensidad de la tinción y un trayecto irregular. (Gráfica 1; Figs. 2C y 2E).

Además destacó la presencia de núcleos de localización central observados en la sección transversal de fibras musculares localizadas dentro de áreas de extensa infiltración tumoral (Fig. 2C-2D). La morfología de dichos núcleos centrales no corresponde a la de los núcleos de la fibra muscular, que son de localización periférica, fusiformes, pálidos y con varios nucléolos bien definidos.

Además de los hallazgos anteriores, se observaron cambios tintoriales en los cortes teñidos con el método tricrómico de Masson.

Las fibras musculares aparecen teñidas con tono azul de diversa intensidad (Fig. 2F), al contrario del tono rojo brillante que muestran las fibras musculares de las muestras control sin células TC-1 (Fig. 2A).

3.2 HISTOQUÍMICA

La lámina externa de las fibras musculares normales se demuestra con la técnica histoquímica de PAS con diastasa, como una línea delgada y continua de color magenta (Fig. 3A). En las muestras de los animales implantados con céls. TC-1, se observó discontinua o fragmentada, incluso ausente en algunas áreas. Estas alteraciones se encontraron asociadas a la presencia de células TC-1 (Fig. 3C).

También se observaron células tumorales con citoplasma PAS positivo (Fig. 3D). Además, se localizaron depósitos de material amorfo PAS positivo, en el espacio extracelular, en la cercanía de las células tumorales. (Fig. 3B).

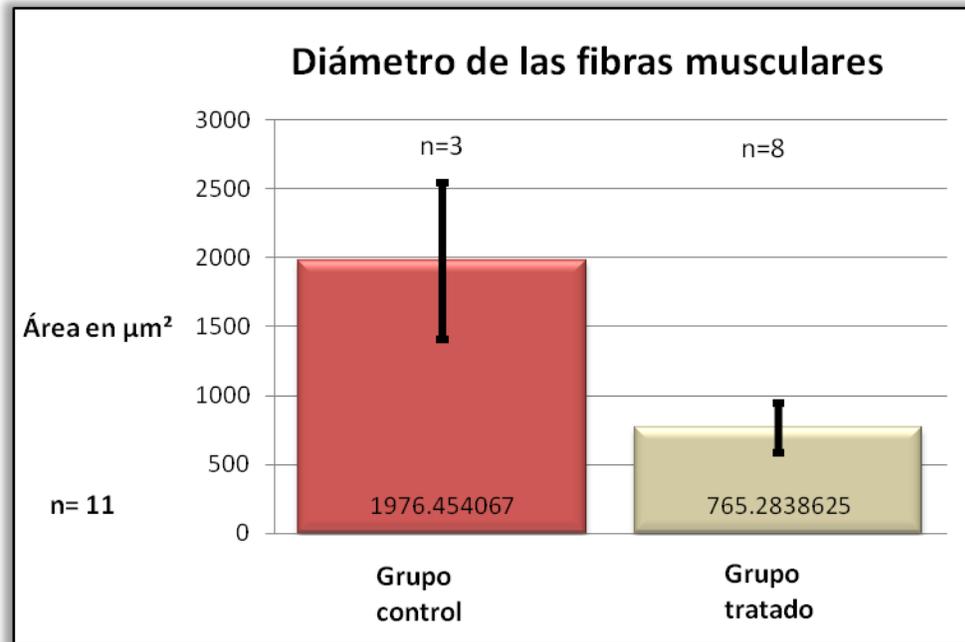
3.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

Se comprobó la presencia de las células tumorales TC-1 por medio del marcaje inmunohistoquímico con anticuerpos anti-citoqueratinas AE1 y AE3 (Fig. 4A) y se observó infiltración severa hacia las fibras musculares, que por su parte, fueron identificadas con anticuerpos anti-actina específica para ME

(Fig. 4B). Ambos anticuerpos comprueban la presencia de células tumorales TC-1 localizadas dentro de las fibras musculares invadidas; en los cortes marcados con anticuerpos anti-citoqueratinas se observa la positividad en las céls. que se encuentran al interior de las fibras musculares (Fig. 4C), mientras que con el marcaje con anticuerpos anti-actina específica para ME, se observaron fibras musculares con positividad, y células tumorales negativas en su interior (Fig. 4D).

3.4 MORFOMETRÍA

Se corroboró, por medio de una prueba de medias para dos muestras independientes, que el área de corte transversal de las fibras musculares de los ratones con el implante de céls. TC-1 era menor que el área de las fibras musculares de ratones del grupo control sin implante, rechazándose la hipótesis nula de que no hay diferencia entre las medias de ambos grupos ($n=11$, Sig. Asint. Bil. $=0.000$, $\alpha=0.05$), como se aprecia en la gráfica 1.



Gráfica 1. Histograma de las áreas transversales (en μm^2) de fibras musculares del grupo control (en color rojo) y del grupo implantado con células TC-1 (en color marrón). Se aprecia la diferencia entre ambos grupos tanto en el promedio de área transversal de cada grupo como en sus respectivas desviaciones estándar.

Fig. 2. A. Fibras musculares del grupo control. Las fibras musculares mostraron el color rojo brillante y el diámetro característicos de las fibras musculares normales teñidas con el método tricrómico de Masson. Inclusión en parafina. Tricrómico de Masson. 20x.

B. Muestra de ME en el sitio de implante de células TC-1. En la parte izquierda de la imagen se observó la masa de células tumorales (asterisco), algunas de las cuales infiltraron el endomisio de un haz de fibras musculares; las fibras musculares observadas tuvieron una coloración de intensidad heterogénea, que varió desde el rojo brillante normal hasta el rosa pálido (cabezas de flecha). Inclusión en parafina. Tricrómico de Masson. 20x.

C. Fibras musculares con tinción y tamaño irregulares, que están infiltradas por células tumorales; la mayoría de las fibras musculares mostraron una disminución de sus dimensiones (círculo) en comparación con el grupo control, además, algunas de estas fibras musculares presentaron núcleos en el centro (flechas). En la esquina inferior derecha se observó tejido adiposo. Inclusión en parafina. Tricrómico de Masson. 80x.

D. Fibras musculares; obsérvese la fibra muscular del centro, que presentó un grupo de células TC-1 en su interior, y sus bordes se observaron rasgados. Inclusión en parafina. Tricrómico de Masson. 20x.

E. Fibras musculares, cortadas en sentido longitudinal, que están situadas entre una masa de células tumorales; destacó la disminución del calibre de las fibras musculares (cabeza de flecha). También se apreció una disminución de la intensidad de la tinción, separación entre las fibras musculares y trayecto ondulado. Inclusión en parafina. Tricrómico de Masson. 20x.

F. Área que presenta varias fibras musculares fragmentadas con presencia de células tumorales (en círculos); en la mitad inferior de la imagen, las fibras musculares presentaron cambios tintoriales indicados por el tono azul, que contrasta con el tono rojizo de las fibras musculares en la parte superior. Inclusión en parafina. Tricrómico de Masson. 20x.

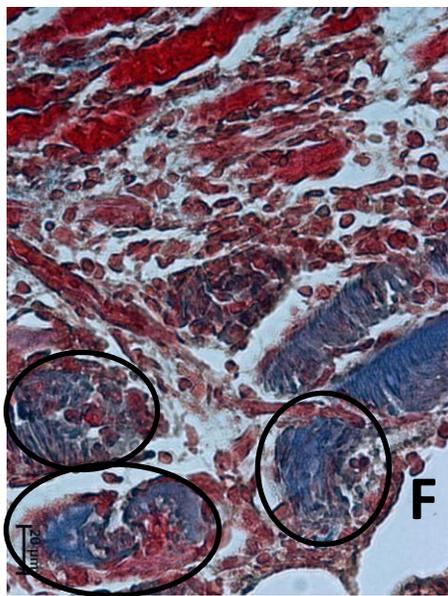
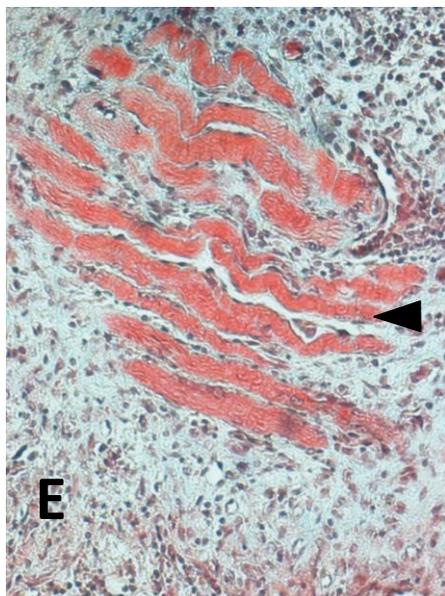
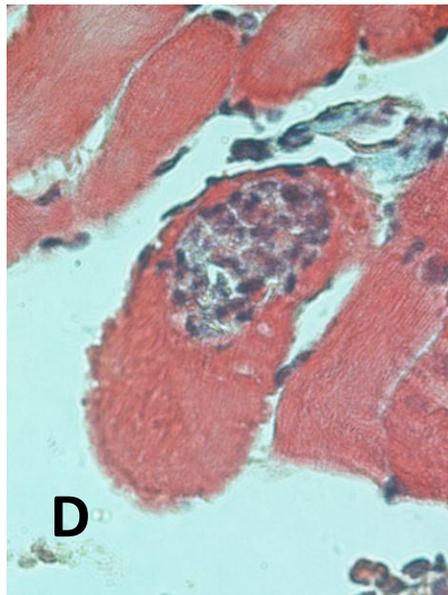
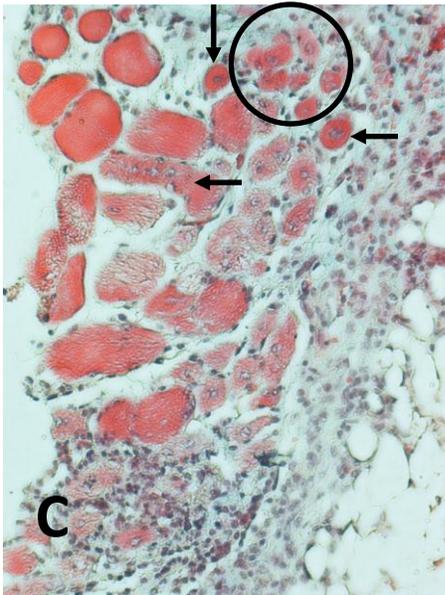
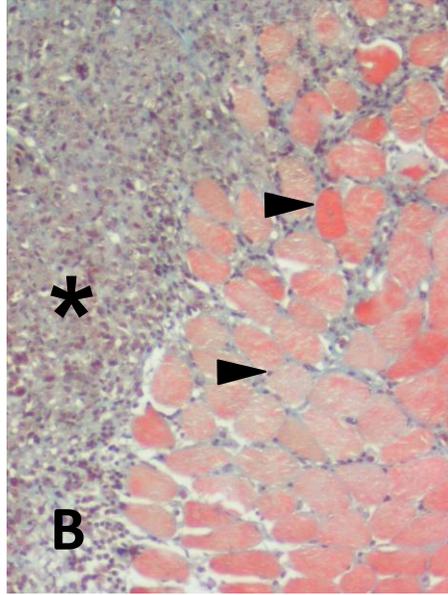
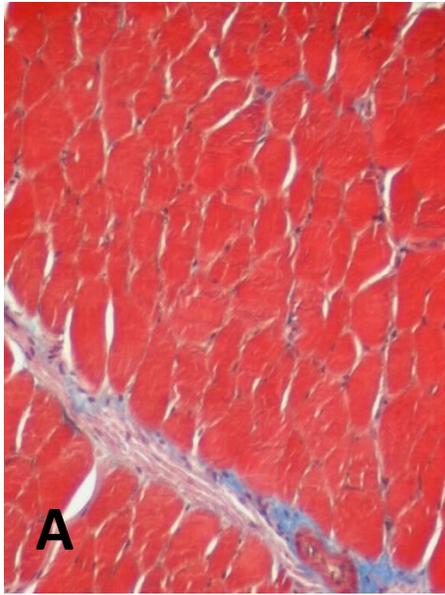


Fig. 3. A. Fibras musculares del grupo control cortadas en sentido longitudinal, donde se muestra la lámina externa como una delgada línea recta y continua de color magenta PAS positiva (flechas). Inclusión en parafina. Técnica de PAS con diastasa. 100x.

B. Perfil de varias fibras musculares cortadas en sentido longitudinal, donde se aprecia un depósito extracelular de material amorfo PAS-positivo color magenta, con la presencia de algunas células. Inclusión en parafina. Técnica de PAS con diastasa. 100x.

C. Fibras musculares del grupo implantado cortadas en sentido longitudinal, donde la fibra muscular del centro se encuentra destruida, invadida por gran cantidad de células tumorales y un aumento de la positividad de la reacción de PAS con diastasa. La lámina externa mostró continuidad (cabeza de flecha), interrupciones en su trayecto, y se observó fragmentada en la mayor parte de la imagen (flechas). Inclusión en parafina. Técnica de PAS con diastasa. 100x.

D. Fibra muscular en un corte longitudinal, donde se observan parte de la fibra muscular con varias células invasivas que se sitúan en una zona que presenta interrupción de las miofibrillas. Las células invasoras muestran un citoplasma PAS positivo. Inclusión en parafina. Técnica de PAS con diastasa. 100x.

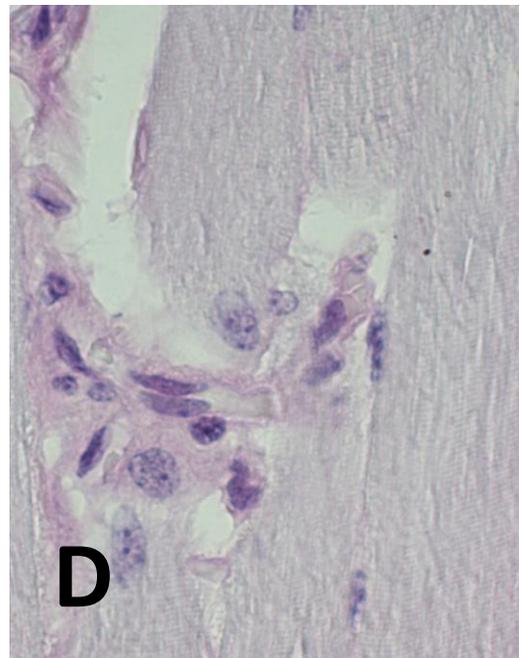
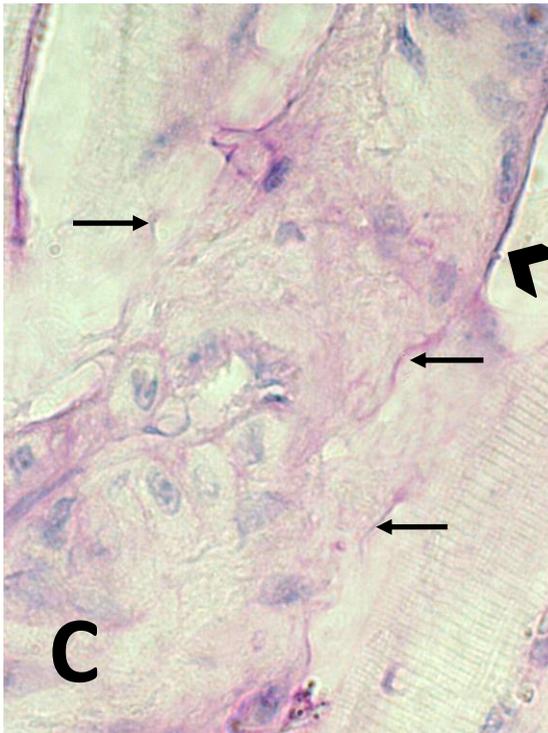
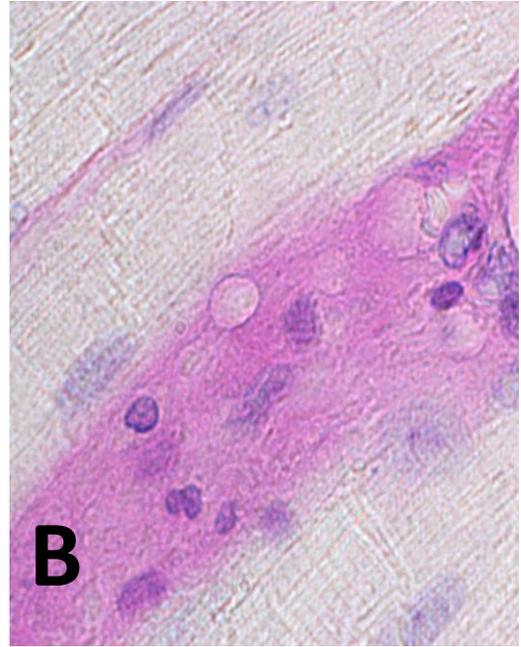
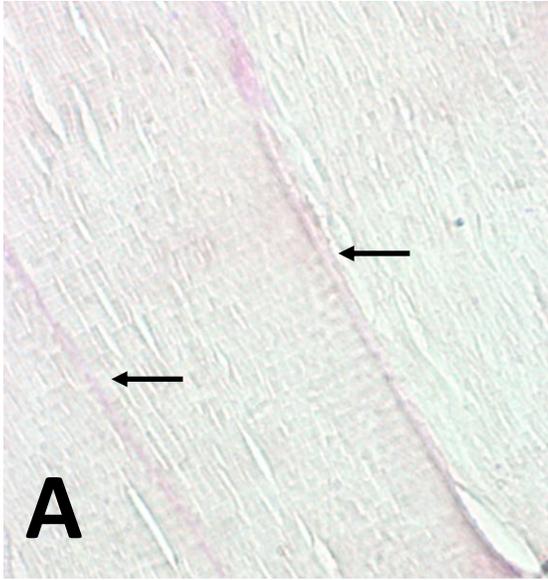
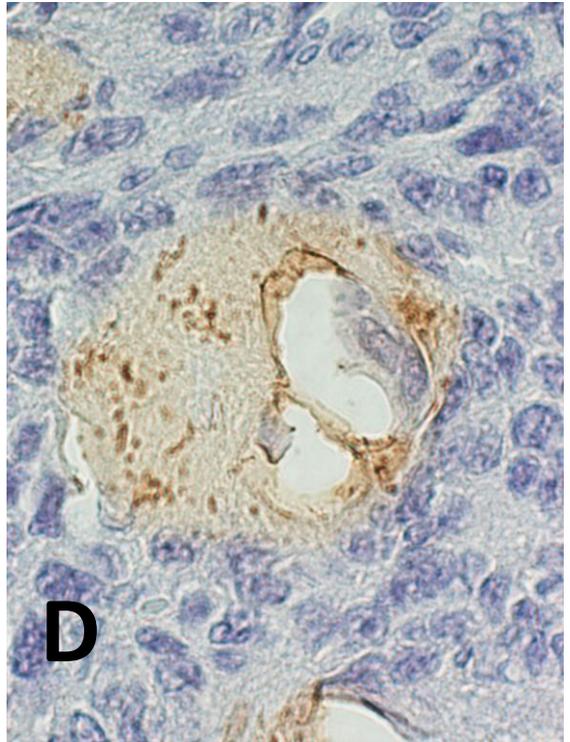
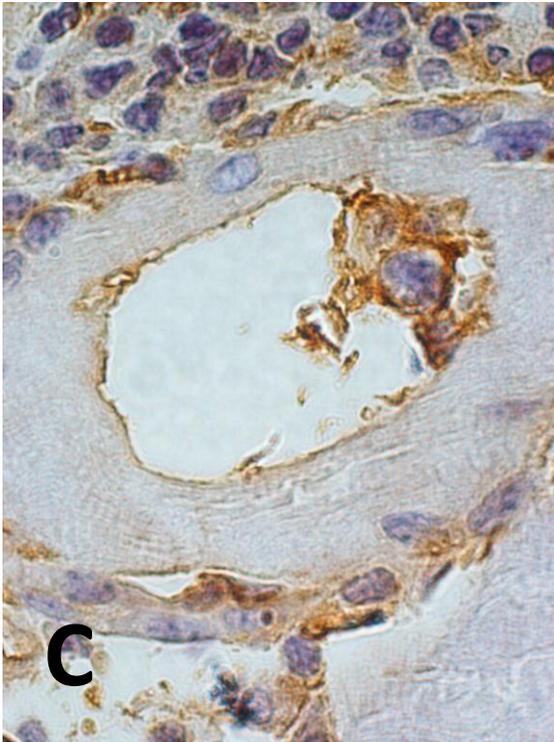
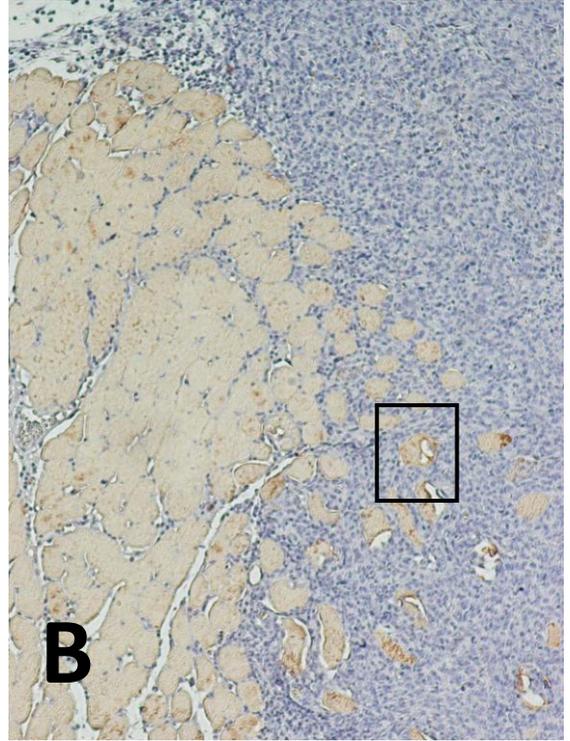
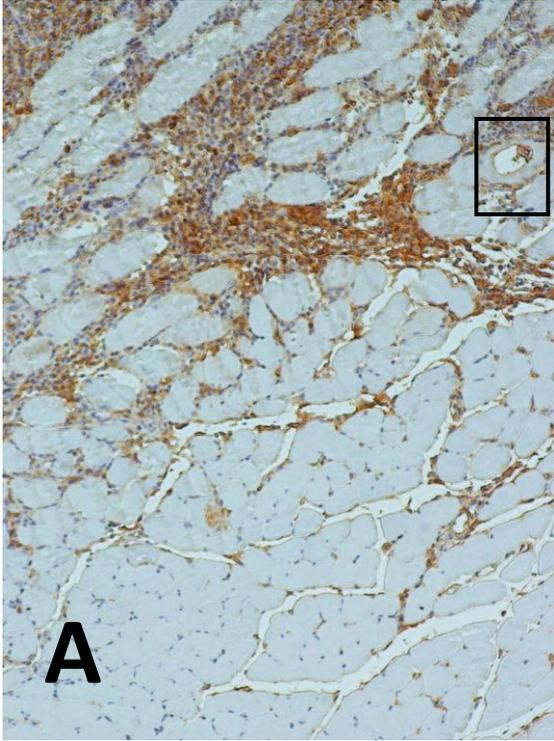


Fig. 4. A. Porción de ME cortado en sentido transversal. Se observa infiltración al endomisio por parte de células que muestran inmunorreactividad a anticuerpos anti-citoqueratinas, y además se encuentran espacios anormales entre las fibras musculares. Inclusión en parafina. Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-citoqueratinas. 20x.

B. Fascículo muscular cortado en sentido transversal que se muestra infiltrado por una masa de células tumorales. Las fibras musculares muestran inmunorreactividad al marcaje anti-actina específica para ME; las células infiltrantes separan las fibras musculares y hay presencia de espacios entre éstas. Inclusión en parafina. Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-actina. 20x.

C. Ampliación del recuadro de la imagen 4A de una fibra muscular cortada en sentido transversal y rodeada por células tumorales. Dicha fibra muscular muestra un espacio en su interior donde se observan células tumorales invasivas, que se distinguen por su inmunorreactividad a los anticuerpos anti-citoqueratinas, al igual que las células que se encuentran a su alrededor. Inclusión en parafina. Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-citoqueratinas. 80x.

D. Ampliación del recuadro de la imagen 4B de una fibra muscular cortada en sentido transversal y rodeada por células tumorales. Semejante a la imagen anterior, la fibra muscular muestra un espacio interior donde se encuentran células invasivas, y en este caso es posible observar que éstas no muestran inmunorreactividad a los anticuerpos anti-actina. Inclusión en parafina. Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-actina. 80x.



3.5 EVALUACIÓN ULTRAESTRUCTURAL

En el análisis ultraestructural de las muestras obtenidas del grupo experimental, se observaron células tumorales que infiltraban el endomisio entre las fibras musculares (Fig. 5A). Las células tumorales presentaron un núcleo grande heterocromático y un citoplasma reducido con presencia de numerosas vesículas de electrodensidad y tamaño variable; otra característica observada fue la presencia de múltiples proyecciones del sarcoplasma en forma de pseudópodos (Fig. 5B).

En los sitios donde hay presencia de células tumorales se observaron varias alteraciones en las fibras musculares adyacentes. El sarcolema presentó rupturas, observándose además un espacio entre el sarcoplasma y las miofibrillas (Fig. 6A y 6B). Asimismo la lámina externa presentó variaciones en su grosor y se encuentra fragmentada (Fig. 5C). Además de encontrarse vesículas de electrodensidad variable en el citoplasma de las células tumorales, también se observaron vesículas debajo del sarcolema en los sitios donde éste presentaba rupturas (Figs. 6B), denominadas en tal caso como vesículas subsarcolemales. Por su parte, las miofibrillas de las fibras dañadas mostraron pérdida de electrodensidad, separación entre sí, un trayecto irregular e interrumpido con fragmentación y separación de sus miofilamentos (Fig. 5A y 6C).

Por último, se apreciaron cúmulos de mitocondrias adyacentes al área de interacción de las fibras musculares con las células tumorales (Fig. 7B).

Las mitocondrias observadas en todas las micrografías presentaron alteraciones evidenciadas por irregularidades en su electrodensidad y en la organización de las crestas. Algunas mitocondrias, con alteraciones semejantes, se encontraron en el medio extracelular (Fig. 5A y 7A), donde también se apreciaron vesículas de electrodensidad variable (Figs. 5A y 6C).

Fig. 5. A. Células tumorales infiltrantes situadas en el endomisio entre las fibras musculares; la fibra muscular de la parte superior de la imagen esta en contacto con prolongaciones citoplásmicas de las células infiltrantes que se introducen entre las miofibrillas (óvalo); se observan vesículas de electrodensidad variable en el espacio extracelular. En la parte inferior derecha de la imagen se observa una fibra muscular con baja electrodensidad y separación entre sus miofibrillas (asterisco). Inclusión en resina epóxica. Contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo. Microscopia electrónica de transmisión.

B. Célula tumoral en contacto con una porción de una fibra muscular. La célula tumoral tiene forma alargada y constreñida al centro, el núcleo ocupa la mayor parte del citoplasma y contiene eucromatina al centro y la heterocromatina hacia la periferia nuclear, el citoplasma es escaso con numerosas vesículas de electrodensidad variable y presenta prolongaciones citoplásmicas en forma de pseudópodos (cabezas de flecha). Inclusión en resina epóxica. Contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo. Microscopia electrónica de transmisión.

C. Acercamiento de la imagen anterior: Pseudópodos de una célula tumoral cercanos a una porción de una fibra muscular esquelética; la célula tumoral muestra algunas vesículas electrolúcidas en su citoplasma, mientras que la fibra muscular muestra algunas mitocondrias con electrodensidad heterogénea; la lámina externa presenta interrupciones y variaciones en su grosor (área dentro del círculo). En algunos lugares de esta zona, también se observan interrupciones del sarcolema (flechas). Inclusión en resina epóxica. Contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo. Microscopia electrónica de transmisión.

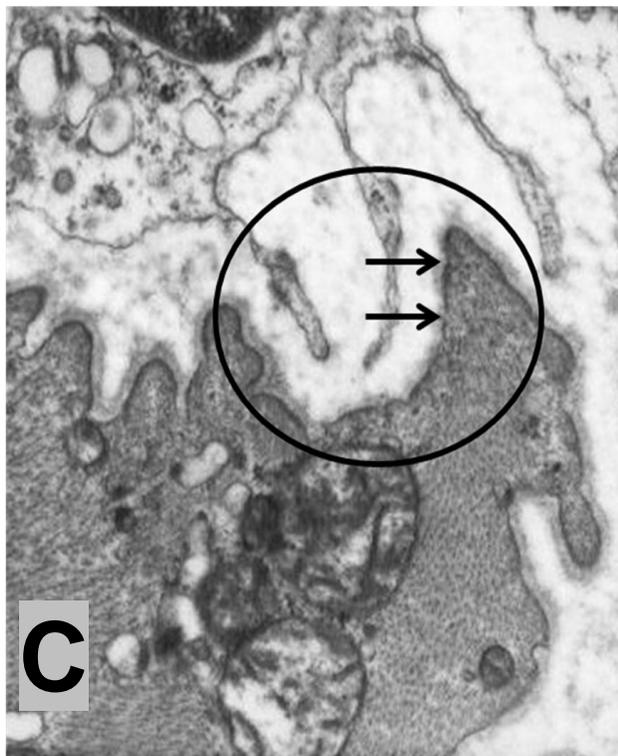
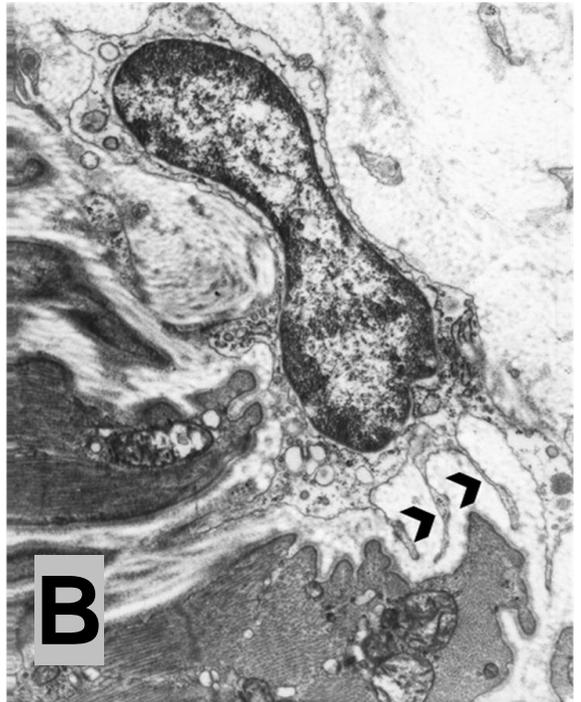
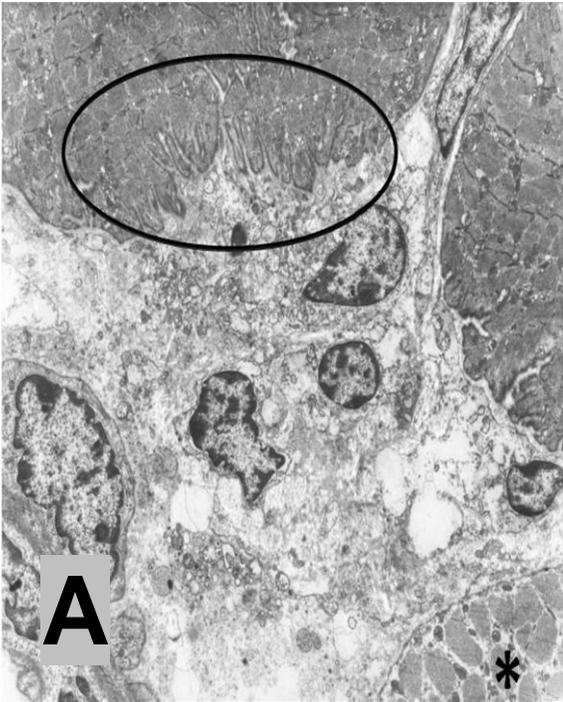
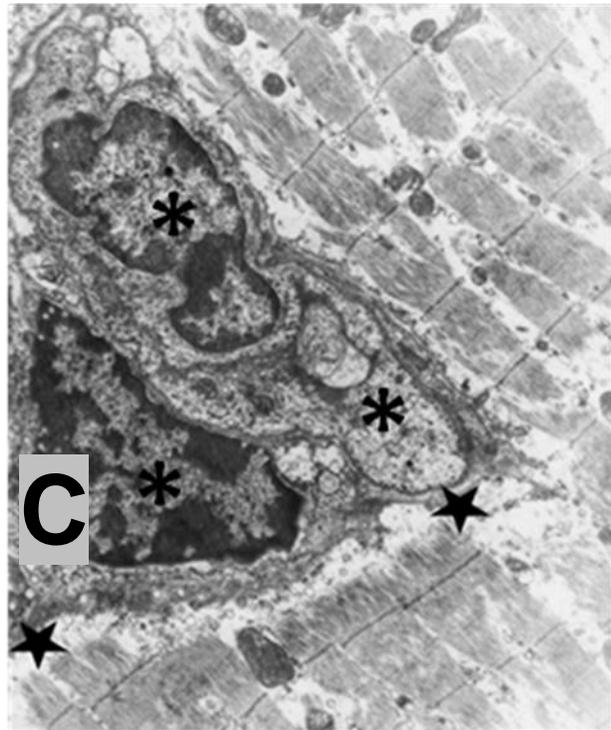
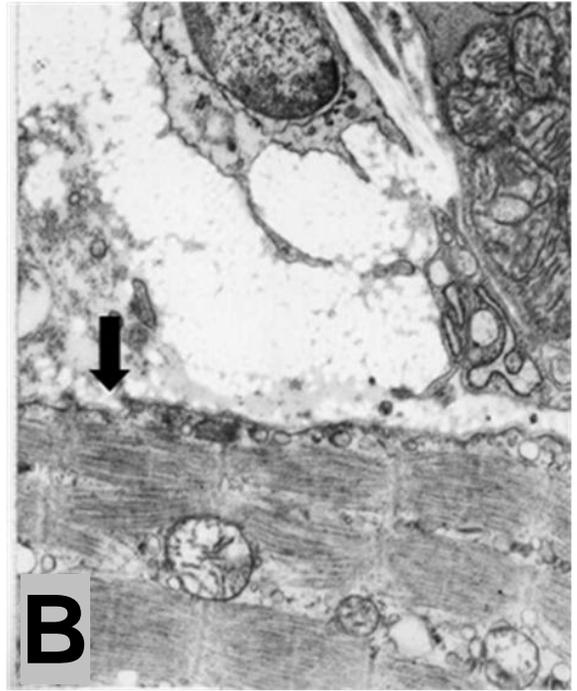
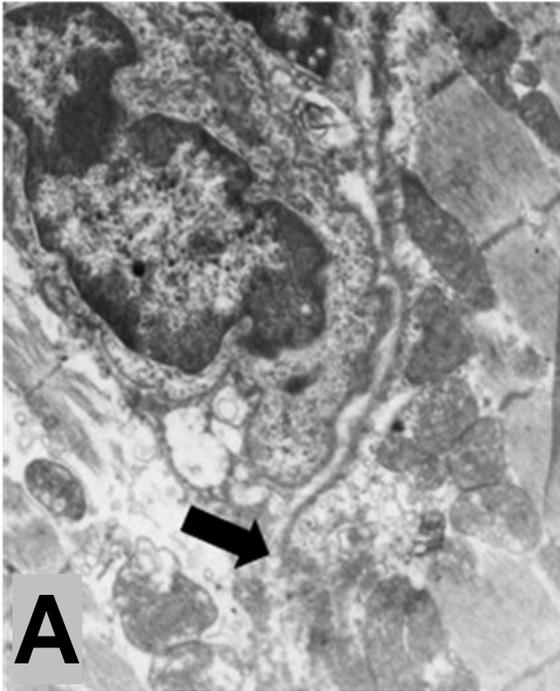


Fig. 6. A. Célula tumoral cercana a la lámina externa de una fibra muscular; la célula tumoral posee un núcleo grande con heterocromatina en la periferia y su citoplasma presenta vesículas; la fibra muscular de la parte derecha de la imagen presenta una zona entre el sarcolema y las miofibrillas donde se sitúan varias mitocondrias y vesículas; El sarcolema y la lámina externa muestran una interrupción en su trayecto (flecha). Inclusión en resina epóxica. Contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo. Microscopia electrónica de transmisión.

B. Porción de una célula tumoral entre 2 porciones de fibras musculares; la célula tumoral, en la parte superior de la imagen, muestra varios pseudópodos; la porción de ME situada a la derecha de la imagen presenta mitocondrias cerca del sarcolema, mientras que la fibra muscular de la parte inferior presenta miofibrillas cortadas en sentido longitudinal, y se observan varias mitocondrias situadas entre las miofibrillas; el sarcolema presenta una interrupción en su continuidad (flecha) y vesículas subsarcolemales. Inclusión en resina epóxica. Contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo. Microscopia electrónica de transmisión.

C. Perfiles de tres células tumorales (asteriscos) situadas dentro de una fibra muscular esquelética; sólo se observaron los núcleos de dos células tumorales, con las características semejantes a las mencionadas con anterioridad. Las miofibrillas de la fibra muscular presentan rupturas y miofilamentos desorganizados; en la región entre éstas y las células TC-1 se observan vesículas de electrodensidad variable (región delimitada por estrellas). Inclusión en resina epóxica. Contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo. Microscopia electrónica de transmisión.



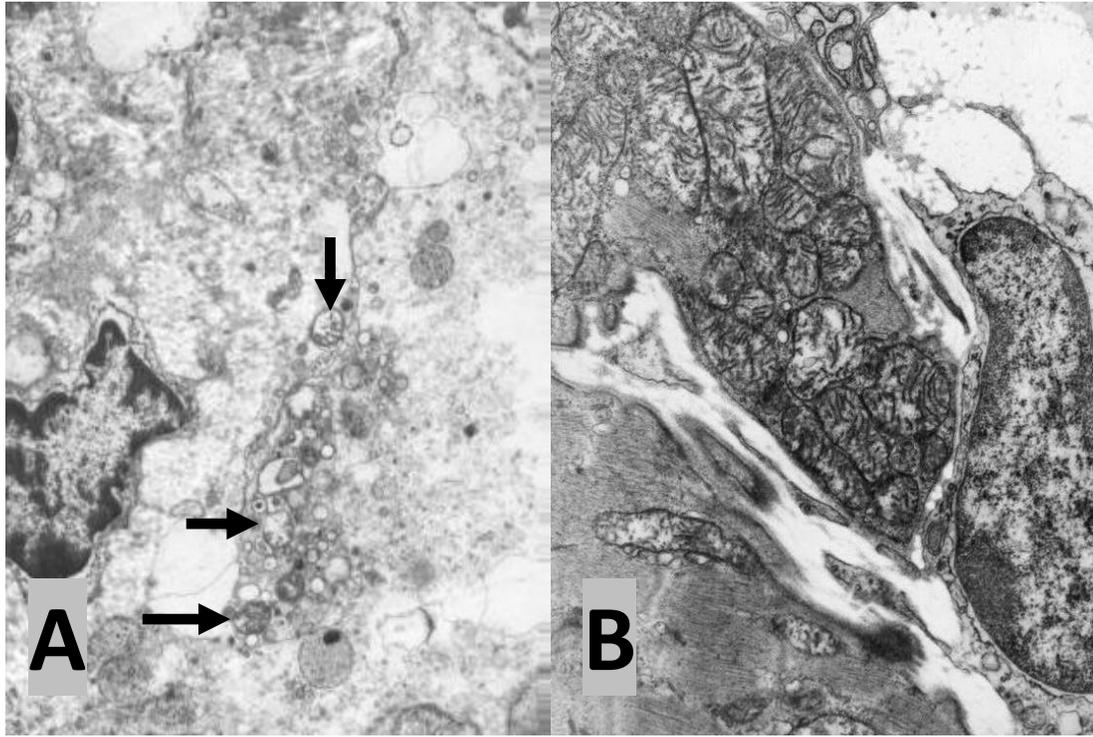


Fig. 7. A. Región extracelular donde se observa parte de una célula tumoral y numerosas vesículas de electrodensidad variable e incluso varias mitocondrias (flechas). La célula muestra un núcleo grande con heterocromatina hacia la periferia y citoplasma escaso. Inclusión en resina epóxica. Contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo. Microscopia electrónica de transmisión.

B. Célula tumoral con pseudópodos en contacto con una fibra muscular; en este caso se aprecian cúmulos de mitocondrias adyacentes a la zona de contacto con la célula tumoral, las cuales presentan electrodensidad heterogénea. Inclusión en resina epóxica. Contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo. Microscopia electrónica de transmisión.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, se logró evaluar el efecto que el implante de células TC-1 provocó en el tejido muscular, y demostrar que dichas células tumorales invadieron las fibras musculares hasta su interior, logrando atravesar la lámina externa y el sarcolema para situarse en el sarcoplasma.

Con el método tricrómico de Masson, las fibras del ME adyacentes a las células TC-1 mostraron alteraciones en estructurales. Una de ellas fue la atrofia,^{26,27} y la mayoría de las fibras atróficas presentaron disminución de la intensidad de la tinción. En promedio, las fibras musculares del grupo implantado tuvieron un área transversal menor que el grupo control, a tal grado que, gráficamente, las SD del grupo implantado y del grupo control no llegaron a traslaparse. Esta disminución del área transversal de las fibras con implante fue mas marcada en las zonas donde hubo células tumorales adyacentes.

Con el microscopio electrónico de transmisión se observaron en este estudio alteraciones que coinciden con reportes anteriores de ME con otros tipos de céls tumorales. La desorganización general de las miofibrillas, que se observaron muy separadas entre sí, ha sido reportada por Lamura y cols.²⁷ en pacientes de carcinoma epidermoide de lengua.

La presencia de espacios entre los miofilamentos y miofibrillas con trayectos irregulares o bien interrumpidos, han sido reportados en modelos experimentales con animales.^{22,25,26}

De forma paralela a la disminución de la tinción, se observaron fibras cuyas miofibrillas muestran baja electrodensidad. Tanto la atrofia como la disminución de la intensidad de tinción se deben a un menor número de miofibrillas normales. El tipo de inmunorreactividad de las fibras musculares del sitio del implante con céls. TC-1 marcadas con los anticuerpos anti-actina, demostró que hay presencia irregular de dicha proteína, ya que las miofibrillas no mostraron una intensidad uniforme de la positividad. Es probable que este hallazgo se deba a una mayor tasa de degradación de proteínas de los miofilamentos como parte del proceso invasivo de las células TC-1.

Algunas fibras musculares, independientemente de que experimentaran atrofia, mostraron un tono azul de diversa intensidad, que contrastó con el color rojo brillante que se espera en las fibras musculares normales. La razón de este hallazgo no puede explicarse, ya que no se conocen con certeza las moléculas que se unen a los tres colorantes empleados en el método de tricrómico de Masson. Sin embargo, los cambios tintoriales antes mencionados sugieren cambios en las propiedades fisicoquímicas de las fibras musculares que son invadidas por las células TC-1.

En las muestras analizadas, fue posible observar dos tipos de interacción de las fibras musculares con las células tumorales.

En microscopia de campo claro se observaron a las células tumorales TC-1 formando masas de células que infiltraron el perimisio y el endomisio separando las fibras musculares entre ellas. Esta infiltración es la forma de interacción más común y se presenta en cualquier tipo de cáncer.²² Las células tumorales presentes en el endomisio separaron las fibras musculares entre ellas y de esta forma alteraron el arreglo estructural normal que contribuye a que el ME realice sus funciones de manera óptima, haciéndolo tal vez más vulnerable ante las células tumorales.

El segundo tipo de interacción, la invasión intrasarcoplásmica, se observó tanto con el método tricrómico de Masson como a nivel ultraestructural. A microscopia óptica se observan fibras musculares invadidas con la presencia de agregados de células tumorales completamente dentro de ellas. El origen epitelial de las células de estos agregados se demostró con el marcaje inmunohistoquímico con anticuerpos anti-citoqueratinas AE1 y AE3. Estas células continúan expresando este tipo de proteínas que prueban su origen primario de epitelio pulmonar.¹ En relación con el modelo utilizado en este trabajo, donde se implantaron células tumorales en el tejido conectivo adyacente al ME, Mathis y cols. (2009)¹³ y Seely (1980),¹² sugieren que el ME aparentemente es más vulnerable a la invasión de tumores malignos de tejidos adyacentes. La invasión intrasarcoplásmica se apreció con el microscopio electrónico de transmisión como células tumorales completamente dentro de fibras musculares y sin estar separadas de éstas por el sarcolema.

A pesar de haberse observado alteraciones en las miofibrillas vecinas a las células tumorales, el daño no fue generalizado. Este tipo de invasión, incluyendo estudios tanto en modelos animales como en pacientes, ha sido escasamente reportada.^{20,21,23,24}

Se pudo apreciar, en imágenes ultraestructurales, que las mitocondrias de las fibras infiltradas lucen una electrodensidad heterogénea y alteraciones en las crestas,^{25,27} y en algunos sitios se observan cúmulos de mitocondrias en las proximidades de las células tumorales.²²

Una de las barreras que las células cancerosas deben atravesar para infiltrar el ME es la lámina externa. En este estudio, la lámina externa se identificó en microscopia óptica con la técnica de PAS modificada con diastasa, que demuestra presencia de los polisacáridos complejos. Con esta técnica se identificaron lugares donde la lámina externa estaba fragmentada y discontinua.²⁶ Las imágenes ultraestructurales también presentan áreas donde la lámina externa mostró alteraciones en el grosor y la continuidad. En estos sitios se observaron células tumorales en las cercanías, lo cual sugiere la presencia de enzimas proteolíticas que degradan componentes de la lámina externa. Por otro lado, la presencia de vesículas subsarcolemas cerca de áreas de ruptura del sarcolema y la lámina externa puede deberse a un proceso degradativo. Recientemente, en nuestro laboratorio se observó, empleando un marcaje inmunohistoquímico, la presencia de la enzima Metaloproteinasa de la Matriz-9 (MMP-9) en las células TC-1 (Dr. Julio Sepúlveda S., *com. pers.*),

que genera resistencia en células tumorales ²⁹ y que se ha relacionado con el comportamiento invasivo y metastásico esencialmente en todos los tipos de tumores malignos.^{30,31} La presencia de esta enzima refuerza la hipótesis de que las células TC-1 invaden a las células musculares a través de la degradación de la lámina externa.

La técnica de PAS demostró también la positividad del citoplasma de las células TC-1, así como de depósitos extracelulares de material amorfo. La razón de la positividad en estos sitios permanece incierta, sin embargo es probable que las células TC-1 expresen y secreten polisacáridos complejos similares a los de la membrana basal que sean un microambiente favorable a su desplazamiento como parte de su potencial invasivo; también es probable que los depósitos extracelulares sean restos de la degradación de la lámina externa.

Uno de los hallazgos ultraestructurales más característicos de las células tumorales fue la presencia de prolongaciones citoplásmicas. Se encontraron filopodios y prolongaciones mas gruesas, que tal vez sean secciones de lamelipodios. Las prolongaciones citoplásmicas son un medio tanto de locomoción como de detección de las condiciones en el frente de avance. La estructura deformada de algunas células tumorales observadas permite suponer que se encontraban migrando activamente.

Un hallazgo destacado en las fibras musculares y en las células tumorales fue la presencia de múltiples vesículas de tamaño y electrodensidad variable. En el caso de las fibras musculares, la presencia de vesículas subsarcolemales es indicativa de fragmentación de la membrana de las fibras musculares. Brandes y cols. (1967,²² observaron gran cantidad de lo que denominaron vesículas micropinocíticas.

En el presente trabajo se observaron signos que son sugestivos de necrosis, tales como la gran cantidad de vesículas citoplásmicas en el medio extracelular, de acuerdo con lo observado por Babai (1976),²⁵ que destaca el aumento de vesículas densas en el medio extracelular. Otro signo sugestivo fue la presencia de mitocondrias con electrodensidad heterogénea y alteraciones en sus crestas.

El modelo murino que se utilizó en el presente trabajo, empleó células tumorales que son capaces de infiltrar un tejido como el ME, atravesar la lámina externa e incluso invadir el sarcoplasma de las fibras musculares en un periodo de 10 días, cuando incluso no hay tumoración detectable. Este grado de agresividad y de invasividad debe tomarse en cuenta cuando se emplee un modelo con ratones C57BL/6 como éste y las células TC-1, sobre todo para la valoración de inmunoterapia y otros tratamientos antitumorales.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIÓN

Las células TC-1 son células tumorales altamente invasivas y por lo tanto con un grado elevado de malignidad, tal como se ha descrito para las células tumorales que logran invadir el ME. Este hecho debe tenerse en cuenta cuando se emplea esta cepa de células tumorales en modelos de tratamiento para el cáncer.

5.2 PERSPECTIVAS

1. Identificar la presencia de proteasas secretadas por las células TC-1.
2. Realizar una evaluación similar a la de este modelo en animales sometidos a tratamientos antitumorales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Lin K, Guarnieri F, Staveley-O'Carroll K, Levitsky H, August J, Pardoll D, Wu T. 1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 56:21-26.
- 2.- Šmahel M, Šíma P, Ludvíková V, Marinov I, Pokorná D, Vonka V. 2003. Immunisation with modified HPV16 E7 genes against mouse oncogenic TC-1 cells sublines with downregulated expression of MHC class I molecules. *Vaccine* 21:1125-1136.
- 3.- Ji H, Chang E, Lin K, Kurman R, Pardoll D, Wu T. 1998. Antigen-specific immunotherapy for murine lung metastatic tumors expressing human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Int J Cancer* 78:41-45.
- 4.- Welsch U. 2009. *Histología de Sobotta 2/e*. Edit. Médica Panamericana, pp. 157-166.
- 5.- Gartner L, Hiatt J. 2007. *Texto atlas de Histología 3/e*. McGraw Hill, pp. 157-175.
- 6.- Engel AG, Franzini-Armstrong C. 1994. *Miology 2/e, Vol. 1*. McGraw-Hill, pp. 242-260.
- 7.- Argilés JM, Busquets S, López FJ, Figueras M. 2006. Fisiopatología de la caquexia neoplásica. *Nutr Hosp* 21 Supl. 3: 4-9.
- 8.- Combalia A, Sastre S, Casas F. 2004. Lung carcinoma with metastasis to biceps muscle: report of a case and review literature. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 14: 172-176.

- 9.- Tuoheti Y, Okada K, Osanai T, Nishida J, Ehara S, Hashimoto M, Itoi E. 2004. Skeletal muscle metastasis of carcinoma: a clinicopathological study of 12 cases. *Jpn J Clin Oncol* 34(4): 210-214.
- 10.- Chenghua L, Yanyong J, Yongxue L, Xianghong L. 2002. Experimental study on mechanism and rarity of metastasis in skeletal muscle. *Chin Med J* 115(11): 1645-1649.
- 11.- Ueyama H, Kumamoto T, Johno M, Mita S, Tsuda T. 1998. Localized muscle wasting as an initial symptom of skeletal muscle lymphoma. *J Neurol Sci* 154: 113-115.
- 12.- Seely S. 1980. Possible reasons for the high resistance of muscle to cancer. *Medical Hypotheses* 6: 133-137.
- 13.- Mathis S, Fromont-Hankard G, du Boisguéheneuc F, Godenèche G, Mahieu F, Balaboi I, Nocon C, Marsac E, Neau JP. 2009. Les métastases des muscles striés. *Rev Neurol* 166: 295-304.
- 14.- Razak ARA, Chhabra R, Hughes A, England P, Dildey P, McMenemin R. 2007. Metástasis muscular, una presentación muy poco frecuente del cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Med Gen Med.* 9(3): 20.
- 15.- Ferrandina G, Salutari V, Testa A, Zannoni G, Petrillo M, Scambia G. 2006. Recurrence in skeletal muscle from squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a case report and review of the literature. *BMC Cancer* 6(1): 169.
- 16.- Di Giorgio A, Sammartino P, Cardini C, Al Mansour M, Accarpio F, Sibio S, Di Seri M. 2004. Lung cancer and skeletal muscle metastases. *Ann Thorac Surg* 78:709-711.

17.- Türken O, Etiz D, Orhan B, Čermik H, Yaylaci M, Öztürk A, Üskent N. 2002. Thoracic malignancy: case report. Muscle metastasis as initial manifestation of epidermoid carcinoma of the lung. Clin Oncol 14: 129-131.

18.- Faure E, Le Pimpec-Barthes F, Dusser D, Riquet M. 2002. Les métastases musculaires squelettiques des cancers du poumon non à petites cellules. Rev Mal Respir 19(1):93-95.

19.- Sridhar K, Rao R, Kunhardt B. 1987. Skeletal muscle metastases from lung cancer. Cancer 59: 1530-1534.

20.- Slatkin D, Pearson J. 1976. Intramyofiber metastases in skeletal muscle. Hum Pathol 7(3):347-349.

21.- Stratton B, Askin F, Kissane J. 1982. Intramyofiber skeletal muscle invasion in Ewing's sarcoma of bone: clinicopathologic observations from the intergroup Ewing's sarcoma study. Am J Pediatr Hematol Oncol 4(2):231-239.

22.- Brandes D, Anton E, Schofield B. 1967. Invasion of skeletal and smooth muscle by L1210 Leukemia. Cancer Res 27(1): 2159-2178.

23.- Galasko C, Muckle D. 1974. Intrasarcolemmal proliferation of the VX2 carcinoma. Br J Cancer 29(1):59-65.

24.- Carr I, McGinty F, Norris P. 1976. The fine structure of neoplastic invasion of liver, skeletal muscle and lymphatic vessels by the Rd/3 tumour. J Pathol 118(2):91-99.

25.- Babaï F. 1976. Étude ultrastructurale sur la pathogénie de l'invasion du muscle strié par des tumeurs transplantables. J Ultrastruct Res 56:287-303.

- 26.- Gabbert H, Gerharz C, Ramp U, Bohl J. 1987. The nature of host tissue destruction in tumor invasion. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 52:513-527.
- 27.- Lamura A, Finol H, Garriga E, Muller B, Lamura G. 2003. Estudio clínico, histopatológico y ultraestructural del músculo de la lengua en pacientes con carcinoma epidermoide. *Acta Odontol Venez* 41(1):36-43.
- 28.- Soto A, Piñeyro A, Saucedo O, Ramírez R, Waksman N, Sepúlveda J. 2012. Early administration of peroxisomicine A1 (T-514 extracted from *K. parvifolia* seeds) causes necrosis of implanted TC-1 cells without affecting target organs in a murine model. *Int J Morphol* 30(1) [en prensa].
- 29.- Visse R, Nagase H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839.
- 30.- Birkedal H, Moore W, Bodden M, Windsor L, Birkedal B, DeCarlo A, Engler J. 1993. Matrix metalloproteinases: A review. *CROBM* 4(2):197-250.
- 31.- Kleiner D, Stetler W. 1999. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 43(Suppl):S42-S51.

APÉNDICE A

A. TÉCNICAS Y MÉTODOS

A.1. Técnica histológica.

- 1.- Obtener la muestra.
- 2.- Fijar con solución acuosa de formalina.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Deshidratar en etanol a concentraciones graduales de 60% hasta etanol absoluto.
- 5.- Aclarar con xilol.
- 6.- Preincluir en parafina.
- 7.- Incluir en parafina.
- 8.- Obtener los cortes histológicos usando un microtomo.
- 9.- Adherir los cortes en el baño de flotación.
- 10.- Desparafinar e hidratar.
- 11.- Teñir.
- 12.- Deshidratar y aclarar.
- 13.- Montar el cubre objetos añadiendo resina sintética.

A.2. Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (H & E).

- 1.- Desparafinar los cortes con xilol por 5 min.
- 2.- Hidratar con etanol-xilol por 5 min.
- 3.- Hidratar con etanol absoluto y etanol de 96° por 2 min c/u.
- 4.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 5.- Sumergir los cortes en hematoxilina de Gill, 2 min.
- 6.- Enjuagar lentamente en agua de la llave (2 lavados).
- 7.- Sumergir rápidamente en alcohol ácido (1 inmersión).
- 8.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 9.- Sumergir rápidamente en agua amoniaca (2 inmersiones).
- 10.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 11.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 12.- Sumergir los cortes en eosina (6 inmersiones).
- 13.- Deshidratar con etanol de 96° (2 cambios) 2 min c/u.
- 14.- Sumergir en etanol absoluto (2 cambios) 2 min c/u.
- 15.- Sumergir en etanol-xilol 3 min.
- 16.- Sumergir en xilol (2 cambios) 2 min c/u.
- 17.-Montar con resina sintética.

A.3. Técnica de tinción con el método tricrómico de Masson.

Fijar los tejidos con solución acuosa de formalina.

Incluir en parafina.

Usar cortes histológicos de 6 μ m.

- 1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por etanol absoluto hasta agua destilada.
- 2.- Usar como "mordente" el fijador de Bouin por 60 min a 56 °C.
- 3.- Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
- 4.- Enjuagar los cortes en agua destilada.
- 5.- Pasar los cortes a la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min.
- 6.- Lavar en agua corriente por 5 min.
- 7.- Enjuagar en agua destilada.
- 8.- Teñir con la solución de fucsina-escarlata por 1 min.
- 9.- Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
- 10.- Pasar los cortes a la solución de ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
- 11.- Teñir con la solución de azul de anilina durante 1 min.
- 12.- Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante.
- 13.- Pasar al ácido acético por 2 min.
- 14.- Deshidratar en etanol de 96° por unos segundos (cuidar que no se decolore).
- 15.- Continuar con el etanol absoluto hasta aclarar en xilol y montar en resina.

A.4. Técnica histoquímica de Ácido Peryódico de Schiff (PAS) con diastasa.

Fijar los tejidos con solución acuosa de formalina.

Incluir en parafina

Usar cortes histológicos de 4 μ m.

1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcoholes y agua destilada.

* Si se desea remover depósitos de glucógeno, incubar los cortes con diastasa por 30 min. a 37 °C.

- Enjuagar en agua destilada 3 veces.

2.- Sumergir los cortes en la solución del ácido peryódico de 5 a 10 min.

3.- Enjuagar en agua destilada varias veces.

4.- Sumergir los cortes en el reactivo de Schiff por 20 min, revisar el color rosa pálido.

5.- Diferenciar los cortes en la solución enjuagadura sulfurosa, 2 cambios 2 min c/u.

6.- Enjuagar en agua destilada.

7.- Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 1 a 2 min.

8.- Lavar en agua corriente.

9.- Decolorar ligeramente en alcohol ácido y lavar en agua corriente.

10.- Virar con agua amoniacal, lavar en agua corriente y enjuagar en agua destilada.

11.- Deshidratar en alcoholes graduales hasta alcohol absoluto.

12.- Aclarar en xilol y montar en resina.

A.5. Método inmunohistoquímico para actina y citoqueratinas.

Fijar los tejidos con solución amortiguada de formalina.

Incluir en parafina.

Usar cortes histológicos de 4 µm. montados en laminillas cubiertas con solución adhesiva.

1.- Desparafinar e hidratar los cortes en las siguientes soluciones:

- Xilol (2 cambios) 5 min.
- Etanol absoluto 3 min.
- Etanol al 95 % 3 min.
- Etanol al 70 % 3 min.
- Agua destilada 3 min.
- Solución Tris-buffer salino (TBS) 3 min.

2.- Recuperar los antígenos con solución (TRS) 20 min. a 100 °C.

3.- Bloquear la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3 % 10 min.

4.- Lavar en solución buffer TBS 3-5 min.

5.- Añadir el anticuerpo primario (1:100) 45 min.

6.- Lavar en TBS 3-5 min.

7.- Añadir el anticuerpo secundario 45 min.

8.- Lavar en TBS 3-5 min.

11.- Revelar con solución de sustrato-cromógeno 10 min.

Contratinción:

1.- Lavar en agua destilada por 2 min (3 veces).

2.- Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 1 a 2 min.

3.- Lavar en agua corriente.

4.- Enjuagar en agua destilada.

5.- Deshidratar gradualmente con:

- Etanol al 70 %, 2 cambios de 3 min. c/u.
- Etanol al 95 %, 2 cambios de 3 min. c/u.
- Etanol absoluto, 2 cambios de 3 min. c/u.
- Xilol 2 cambios de 5 min. c/u.

4.- Limpiar el exceso de xilol.

5.- Montar y almacenar en oscuridad.

A.5.1 Cubierta de portaobjetos con solución adhesiva de Poli-L-lisina

Sumergir los portaobjetos en la solución de trabajo de Poli-L-lisina en un contenedor de plástico por lo menos por 5 min. y después dejar secar a TA.

A.6. Técnica de preparación de muestras para microscopia electrónica de transmisión.

- 1.- Fijar con solución de Karnovsky-Ito a TA de 30 min a 1 hora.
- 2.- Lavar en buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4, 3 veces 5 min c/u.
- 3.- Postifijar en tetraóxido de osmio 2% en buffer de cacodilatos por 30 min.
- 4.- Lavar en buffer de cacodilatos 3 veces 5 min c/u.
- 5.- Sumergir en nitrato de uranilo 1% 30 min.
- 6.- Lavar en buffer de cacodilatos 3 veces 5 min c/u.
- 7.- Deshidratar con acetona 30%, 50%, 70%, 90% 5 min c/u.
- 8.- Deshidratar con acetona 100% 3 veces por 5 min c/u.
- 9.- Preincluir con acetona-resina epóxica 1:1 por 1 hora o toda la noche.
- 10.- Dejar evaporar bajo campana de extracción por 4 hrs o hasta que la resina se vuelva mas viscosa.
- 11.- Incluir en resina epóxica por 1 hr.
- 12.- Incubar los bloques de 12 a 72 hrs a 60°C para su polimerización.

A partir de los bloques se preparan dos tipos de cortes:

A) Semifinos: de aprox. 1 μm de grosor, estos se montan en portaobjetos y se tiñen con azul de toluidina para su análisis mediante microscopia de luz.

B) Ultrafinos: de aprox. 100 nm de grosor y se contrastan con soluciones de acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.4% para su análisis mediante microscopia electrónica de transmisión.

APÉNDICE B

B. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS:

B.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

B.1.1 Solución acuosa de formalina

* Para preparar 500 mL

Paraformaldehído	20 g
Agua destilada	450 mL

* Calentar a 60 °C por 30 min.

B.1.1.1 Solución amortiguada de formalina

* Para preparar 500 mL

Paraformaldehído	20 g
PBS 1X	450 mL

* Calentar a 60 °C por 30 min.

B.1.2 PBS 10X

* Para preparar 100 mL

NaCl	8.0 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Ajustar pH a 7.2 y almacenar a 4 °C.

B.1.2.1 PBS 1X

* Para preparar 500 mL

PBS 10X	50 mL
Agua destilada	450 mL

Ajustar pH a 7.2 y almacenar a 4 °C.

B.1.3 Solución fijadora de Karnovsky- Ito

Solución madre:

Paraformaldehído	16 g
Agua bidestilada	400 mL

* Calentar cerca del punto de ebullición y agregar varias gotas de hidróxido de sodio para quitar la turbidez.

Solución de trabajo:

Solución madre	400 mL
Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4	400 mL
Glutaraldehído 25 %	32 mL
Ácido pícrico	0.08 g

B.1.4 Glutaraldehído 2.5 %

Glutaraldehído 25 %	10 mL
Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4	90 mL

B.1.5 Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4

Solución A:

Cacodilato de sodio	4.28 g
Agua destilada	100 mL

Solución B:

Ácido clorhídrico	0.5 mL
Agua destilada	25 mL

Solución de trabajo:

Solución A	100 mL
Solución B	5.4 mL

Aforar a 200 mL con agua destilada y ajustar a pH 7.2- 7.4

B.1.6 Tetraóxido de osmio 2 %

Tetraóxido de osmio	1 g
Buffer de cacodilatos 0.1 M pH 7.2- 7.4	50 mL

B.1.7 Nitrato de uranilo 1%

Nitrato de uranilo	1 g
--------------------	-----

Aforar a 100 mL con agua destilada

B.1.8 Resina epóxica

Se preparó resina epóxica de consistencia media

Resina	23.8 mL (29 g)
DDSA	16.0 mL(16 g)
NMA	11.5 mL (14.3 g)
DMP 30	1 mL (1 g)

B.1.9 Azul de toluidina 5 %

Borato de sodio (Borax)	5 g
Agua destilada	100 mL

* Calentar hasta que se disuelva completamente.

Azul de toluidina 1 g

* Añadir a la solución de borato de sodio, agitar para disolver y después filtrar.

B.1.10 Acetato de uranilo 5 %

Acetato de uranilo 0.5 g

Alcohol etílico 50 % 10 mL

* Almacenar en refrigeración y proteger de la luz con papel aluminio.

B.1.11 Citrato de plomo 0.4 %

Citrato de plomo 0.04 g

Agua destilada 10 mL

Añadir unas gotas de hidróxido de sodio 1N hasta disolver.

B.1.12 Hematoxilina de Gill

Agua destilada 730 mL

Etilenglicol 250 mL

Hematoxilina anhidra (polvo) 2.0 g

* Si está en cristales pesar 2.36 g

Yodato de sodio 0.2 g

Sulfato de aluminio 17.6 g

Ácido acético glacial 2.0 mL

* Para preparar se debe seguir el orden, agitar a TA por 1 hr., filtrar antes de usar por primera vez.

B.1.13 Eosina

Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta	1.0 g
Agua destilada	20 mL
Alcohol de 96°	80 mL

Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregar en tres partes de alcohol de 80 °C. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

B.1.14 Solución de alcohol-ácido.

Alcohol de 70°	99 mL
Ácido clorhídrico (HCl)	1 mL

B.1.15 Solución de agua amoniacal.

Agua destilada	99 mL
Hidróxido de amonio	1 mL

B.1.16 Hematoxilina férrica de Weigert

Solución A:

Hematoxilina (anhidra)	1 g
Alcohol de 96°	100 mL

Solución B:

Cloruro férrico acuoso al 29 %	4 mL
Agua destilada	95 mL
Ácido clorhídrico concentrado	1 mL

Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y consistencia, precipita con el tiempo).

B.1.16 .1 Solución de cloruro férrico 29%

Cloruro férrico	14.5 g
Agua destilada	50 mL

B.1.17 Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich

Escarlata de Biebrich al 1 %	90 mL
Fucsina ácida al 1 %	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

B.1.17.1 Solución de escarlata de Biebrich

Escarlata de Biebrich	1 g
Agua destilada	100 mL

B.1.17.2 Solución de fucsina ácida

Fucsina ácida	1 g
Agua destilada	100 mL

B.1.18 Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.

Ácido fosfomolibdico	5 g
Ácido fosfotúngstico.	5 g
Agua destilada	200 mL

* Se recomienda disolver primero el Ac. fosfotúngstico y luego agregar poco a poco el Ac. fosfomolibdico.

B.1.19 Solución de azul de anilina

Azul de anilina	2.5 g
Agua destilada	100 mL
Ácido acético glacial	2 mL

B.1.20 Solución acuosa de ácido acético al 1%

Ácido acético glacial	1 mL
Agua destilada	99 mL

B.1.21 Solución fijadora de Bouin

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75 mL
Formaldehído (36-38 %)	25 mL
Ácido acético glacial	5 mL

B.1.22 Solución enjuagadura sulfurosa

Agua	300 mL
Ac. clorhídrico 1 N	15 mL
Metabisulfito de sodio 10 %	18 mL

B.1.22.1 Solución metabisulfito de sodio 10 %

Metabisulfito de sodio 10 %	10 g
Agua	100 mL

B.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

B.2.1 Solución de trabajo de Poli-L-lisina

Poli-L-lysine solution (Sigma-Aldrich®)	5 mL
Agua ultra-purificada	45 mL

* En la preparación y el uso de esta solución se deben usar contenedores de plástico.

B.2.2 Solución tween 20-tris-buffer salino (TBST)

Envision™ Flex Wash Buffer 20x	25 mL
Agua ultra-purificada	475 mL

B.2.3 Solución recuperadora de antígenos (TRS)

Dako® Target Retrieval Solution High pH 10x concentrate	10 mL
Agua ultra-purificada	90 mL

B.2.4 Solución de sustrato-cromógeno

Envision™ Flex Substrate Buffer	1 mL
Envision™ Flex DAB+Chromogen	50 µL