Annals d'Oftalmologia 2003;11(2):90-94

Obtención y procesamiento de biopsias en oftalmología

M. Carrera

Servei d'Anatomia Patològica
Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge
L'Hospitalet de Llobregat
Barcelona

Resumen

El diagnóstico histológico se basa fundamentalmente en datos morfológicos que en ocasiones pueden ser completados por la microscopia electrónica, la biología molecular, la histoquímica y la inmunohistoquímica. En la selección de las técnicas adecuadas juega un gran papel la información recibida por el patólogo y en el rendimiento de las mismas lo tiene el adecuado procesamiento. Es imprescindible que se valore la importancia de la relación clínico-patólogo desde el mismo momento de realizar la biopsia. La adecuada fijación sigue siendo el primer paso en todo este proceso y depende generalmente del clínico y de la organización de los quirófanos. El diagnóstico molecular será utilizado probablemente cada vez con más frecuencia y el procesamiento de los tejidos es fundamental en este campo.

Resum

El diagnòstic histològic es basa fonamentalment en dades morfològiques que ocasionalment son complertades per la micròscopia electrònica, la biologia molecular, l'histoquímica i l'immunohistoquímica. A la selecció de les tècniques adequades hi juga un gran paper l'informació rebuda pel patòleg. El rendiment d'aquestes tècniques depén en gran part d'un processament adequat. És imprescindible donar valor a la relació clínic-patòleg desde el moment de realitzar la biòpsia. L'adequada fixació segueix sent el primer pas i depén generalment del clínic i de l'organització dels quiròfans. El processament dels teixits és fonamental al diagnòstic molecular que esdevindrà més utilitzat d'ara endavant.

Summary

Pathology diagnosis is still based on morphology that can be helped by electron microscopy, molecular biology, histochemistry and immunohistochemistry. The information received by the pathologist determines the use of those techniques in many cases and the information they provide relies on the quality of the process. A close relation-ship between clinicians and pathologysts is necessary from the start of the whole process. The use of the right fixative is still the first step and depends on the cliniciand on the surgical room organization most of the times. Tissue handling is basic in molecular biology diagnosis and we are now at the begining of the molecular biology era.

Introducción

Si bien es cierto que es beneficioso para el oftalmólogo y para cualquier otro médico el tener unos conocimientos básicos en anatomopatología, también es imprescindible el saber qué hacer cuando se toma una muestra de algún tejido de la región oftalmológica. Las muestras hay que extraerlas con su debida delicadeza y guardarlas en un sistema de conservación que les permita llegar en óptimas condiciones al laboratorio. Además, frecuentemente es importante el conocer el tratamiento que van a recibir estos tejidos, pues condicionará el medio en el que se guardará la muestra, ya sea en fresco, en formol o glutaraldehido. En muchas ocasiones, especialmente en el caso de los tumores, también será conveniente el marcado de la pieza para que el anatomopatólogo conozca su orientación.

En este artículo se dan una serie de directrices que los oftalmólogos deberían tener presentes para un óptimo procesamiento de las muestras de tejidos.

Correspondencia:
Marta Carrera i Plans
Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge
Feixa Llarga, s/n
08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona
E-mail:
mcarrerap @csub.scs.es

Procesamiento de las muestras

Parece obvio que para obtener el máximo rendimiento de las biopsias es imprescindible una estrecha relación clínico patológica y en este sentido nunca se insistirá lo suficiente sobre la importancia de la información clínica que debe acompañar a las biopsias[1] . De esta información depende la interpretación de los hallazgos[2] pero también depende la forma en que la muestra debe procesarse, desde la utilización del tipo de fijación más adecuada [3] hasta la identificación de los bordes. Los ejemplos de la necesidad de compartir información entre clínico y patólogo son muy habituales en la práctica diaria como la identificación de la situación del margen afecto y su correcta localización en la exéresis de una neoplasia, la necesidad de procesar un tejido en congelación para preservar cristales que se diluyen en agua como la cistina o el ácido úrico o si se desea estudiar la presencia de depósitos de inmunoglobulinas como en el caso de lesiones bullosas. Además, no es infrecuente que la información clínica impulse a guardar una porción de la muestra para microscopia electrónica, especialmente ante la sospecha de enfermedades por depósitos[4].

La fijación adecuada es un paso crucial en el procesamiento de las muestras. El fijador más utilizado es la formalina (formol diluido al 40%), la cual es diluida posteriormente por nosotros al 10% y se le añade un tampón de fosfato sódico monobásico. El resultado de esta manipulación es lo que habitualmente llamamos *formol*. La cantidad de líquido que se debe utilizar para la fijación debe ser 10 veces superior al volumen de la muestra obtenida.

Si no se dispusiera de fijador, las muestras pueden conservarse durante varias horas en una nevera envueltas en una gasa húmeda y nunca deben congelarse. Este manera de guardar las muestras es la más adecuada para ciertas preparaciones.

Consideraciones específicas de las distintas muestras tisulares

1. Muestras del segmento anterior ocular: conjuntiva, córnea, iris y trabéculo

Las pequeñas muestras de conjuntiva o iris tienen tendencia a enrollarse o arrugarse al introducirlas en el líquido fijador. Cualquier método que permita que se fijen sobre una superficie plana resuelve este problema. Con la muestra en fresco el mismo cirujano, o en el laboratorio, la puede orientar colocándola sobre un papel de filtro en el que señala la localización de los bordes si fuera necesario. También se puede obtener una fijación correcta de estas biopsias (Figuras 1-3) aplanando la muestra sobre la misma

Figura 1.
La muestra conjuntival se extiende sobre la pared del frasco con fijador

Figura 2.
Se mantiene apoyada sobre la pared unos minutos

Figura 3.
Se baña en el fijador suavemente y se desprende

pared del frasco y dejándola unos dos o tres minutos. Posteriormentse se remueve el formol del fondo y se baña la muestra que se desprenderá de la pared, conservando la forma plana.

Si se trata de una enfermedad con vesículas se tomarán dos muestras antes de fijar, una se procesará en formol para inclusión en parafina y otra congelada para inmunofluorescencia.

Si se trata de la exéresis de una lesión maligna se procesará identificando los bordes con tinta china. Cuando la muestra excede de 3 o 4 mm ya puede ser incluida totalmente en parafina previamente a la sección. El estudio habitual de una exéresis pequeña se realiza tomando una sección completa transversal central y dos secciones de los dos extremos, perpendiculares a la sección central. La certificación de una exéresis completa precisa que los márgenes de la resección puedan observarse pintados por la tinta china (Figuras 4 y 5). La identificación de los bordes puede ser de gran utilidad cuando se precisa una ampliación.

Figura 4.
Margen de resección de una lesión conjuntival identificado por la tinta china del borde

Figura 5.
El color negro de la tinta permite determinar si el epitelio del borde está o no afecto por el carcinoma

La variante de la técnica micrográfica de Mohs para la cirugía de carcinomas escamosos conjuntivales consiste en una exéresis en dos partes: en el primer tiempo se realiza la exéresis del tumor con un pequeño margen y en la segunda parte se extirpa un anillo de 2 mm de conjuntiva normal que rodea la lesión[5].

En la orientación de lesiones de la mucosa conjuntival es muy útil que el cirujano realice un dibujo de la lesión extirpada con la localización de sus bordes. Puede utilizarse la colocación de suturas de distinto color o longitud como método para orientar los bordes.

En el caso del trabéculo, dada la delicadeza de este tejido, es recomendable su estudio en cortes semifinos identificando la orientación de los cortes a estudiar. La fijación será en glutaraldehido como en las muestras fijadas para microscopia electrónica. Una lupa estereoscópica es de gran utilidad para la orientación y localización del tejido. En el estudio del trabéculo se realizan cortes perpendiculares al eje más largo de la muestra[6].

2. Muestras de segmento posterior ocular: coroides, retina y vítreo

Las biopsias suelen ser muy pequeñas, deben envolverse en un papel fino durante el procesamiento y es muy útil darles una coloración rosada con una gota de eosina o cualquier otro colorante, para que puedan ser localizadas con mayor facilidad al elaborar los bloques de parafina[7]. El pequeño tamaño de algunas muestras hace recomendable la fijación e inclusión para microscopía electrónica y su estudio en cortes semifinos

3. Globo ocular completo (enucleación)

La fijación en formol es la más adecuada para el globo ocular. Para ayudar en la orientación de la pieza es útil marcar la inserción de un músculo con un punto, especificando en la petición de cual se trata. En el caso de neoplasias malignas deben procesarse aparte los vasos vorticosos y ciliares, así como una sección del margen de resección del nervio óptico. Es importante practicar secciones paralelas de la lesión y estudiar su relación con el nervio óptico y la esclerótica (Figura 6).

Las calcificaciones de los ojos con ptísis (Figura 7) son muy frecuentes y pueden detectarse previamente a la cirugía mediante una radiografía de cráneo.

Es conveniente decalcificar previamente a la sección con ácido nítrico, pero hay que vigilar que el tiempo de decalcificación no sea excesivo.

Los implantes orbitarios de hidroxiapatita también deben descalcificarse previamente a la inclusión en parafina, sobre todo la forma natural, ya que es muy dificultoso seccionarlos. El polietileno poroso y la alúmina pueden cortarse directamente, aunque con cierta dificultad, con instrumentos adecuados (Figura 8).

4. Muestras de piel y párpado en grosor total

Generalmente, debido al buen rendimiento en el diagnóstico clínico de suposición, las lesiones palpebrales son extirpadas directamente aunque algunas neoplasias de los párpados pueden biopsiarse previamente a la exéresis cuando hay dudas diagnósticas que puedan condicionar la actitud quirúrgica.

Una vez extirpada la lesión, mediante una resección de grosor palpebral total o parcial, debe marcarse mediante una sutura alguno de los márgenes para facilitar la orientación de la pieza en el párpado. Algunos cirujanos marcan siempre, por convención propia, el mismo lado, por ejemplo el medial.

Principalmente, en los tumores de canto medial, los recidivados y los de márgenes infiltrantes, para confirmar que la exéresis tumoral ha sido completa, se pueden tomar varias biopsias intraoperatorias de los márgenes y profundidad. La cirugía micrográfica, una variante de la técnica original de Mohs, consiste en dibujar e ir cortando los márgenes hasta que el estudio de los cortes por congelación resulta negativo.

5. Biopsias orbitarias

En el caso de biopsias incisionales cuyas muestras son menores de 1 cm de diámetro se fijarán totalmente en formol, pero si se trata de muestras más grandes (de parte o la totalidad de la lesión) es preferible enviarla en fresco al laboratorio, especialmente en el caso de neoplasias.

Los laboratorios de anatomía patológica han comenzado la colaboración con los laboratorios de biología molecular en la recogida de muestras para determinación de marcadores pronósticos y de sensibilidad a determinados fármacos (entre otros posibles) que tienen actualmente utilidad o que se prevé que la pueden tener en breve[8]. La creación de bancos de tumores puede resultar beneficiosa para los pacientes en breve plazo de tiempo y es necesaria hoy día como base de investigación. Para la conservación adecuada de las muestras en estos bancos se utiliza la congelación, por lo que es recomendable el hábito de remitir las piezas en fresco a los laboratorios para la obtención de muestras congeladas para los bancos de tumores siempre que el

Figura 6.
Sección de un melanoma de coroides que invade la esclerótica y rodea el nervio óptico

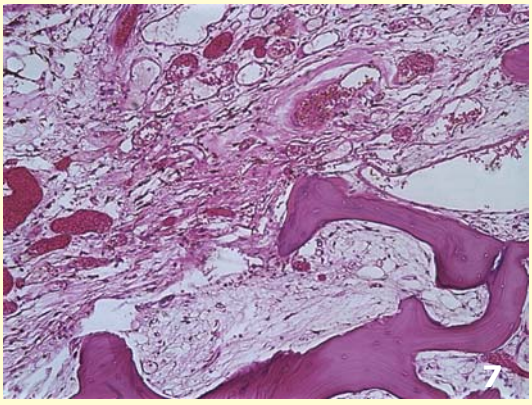

Figura 7.
Calcificación y osificación en la cámara posterior de un ojo ptísico

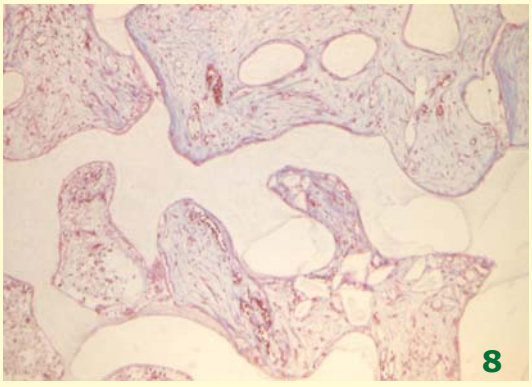

Figura 8.
Implante de hidroxiapatita que ha sido descalcificado y permite observar el tejido conectivo y vasos que rellenan su trama

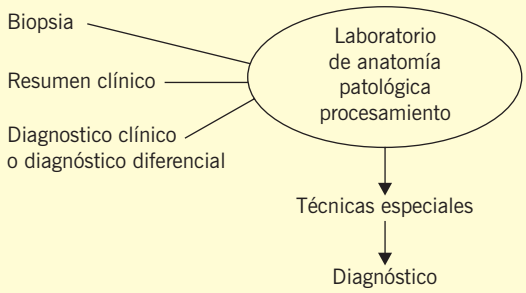

Figura 9. ***Diferentes datos contribuyen al diagnóstico histológico***

tamaño lo haga posible, y su posterior fijación. Todo este procedimiento debe realizarse en el menor tiempo posible para obtener una buena conservación de los tejidos.

En el diagnóstico de los linfomas, por ejemplo, que constituyen un porcentaje elevado de las biopsias de lesiones orbitarias en el adulto (casi el 25% en algunos centros), la correcta obtención (tejido muy frágil) y fijación del tejido permite valorar los estudios inmunohistoquímicos para la tipificación de sus células. Este tipo de estudios es necesario también en la tipificación de tumores no linfoides como las metástasis o en el estudio de neoplasias indiferenciadas. La demostración de tiroglobulina, antígeno prostático o receptores hormonales pueden determinar claramente su origen.

Durante el procesamiento de los tejidos orbitarios el anatomopatólogo debe señalar los márgenes con tinta china siempre que se trate de exéresis tumoral. Esto es muy importante, por ejemplo, para el estudio del margen posterior después de la extirpación de un meningioma de nervio óptico.

En la exenteración el principal dato a demostrar suele ser la ausencia de lesión en los márgenes, por lo que deben identificarse y procesarse escrupulosamente. Puede ser de mucha utilidad para el patólogo la orientación de la TC o RMN previos para la identificación de las áreas de hueso a estudiar. Ocasionalmente, la práctica de una radiografía de la pieza puede aportar esta información.

Conclusión

La correcta recogida y procesamiento de las muestras son esenciales para poder extraerle el máximo rendimiento a la maniobra diagnóstica y quirúrgica practicada. Es preferible conocer el tipo de estudio anatomopatológico que se va ha hacer para guardar la muestra en el medio más adecuado (Figura 9).

Además, para resaltar la importancia del procedimiento de obtención de muestras para biopsia no olvidemos que, aunque la razón del examen de los tejidos reside en su aportación al diagnóstico y tratamiento del paciente, no hay que desdeñar el papel del control de calidad del examen anatomopatológico y, en algún caso, que la biopsia puede acabar por ser casi una acta notarial de la intervención.

Bibliografía

1. Burnier MN Jr. The value of clinicopathological correlation in patient care, teaching and research in ophthalmology. *Can J Ophthalmol* 2003 Feb;38(1):19-22.
2. Zimmerman LE. Pathology and computed tomography. *Ophthalmology* 1980 Jun;87(6):602-5.
3. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory Methods in Histotechnology AFIP American Registry of Pathology. Washington DC: editorial 1992.
4. Zimmerman LE, Font RL, Ts'o MO. Application of electron microscopy to histopathologic diagnosis. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1972 Jan-Feb;76 (1):101-7.
5. Rao NA. *Biopsy Pathology of the Eye and Ocular Adnexa.* Ciutat: Chapman and Hall 1997.
6. Spencer WH, Alvarado J, Hayes TL. Scanning electron microscopy of human ocular tissues: trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol* 1968 Dec;7(6):651-62.
7. Martin DF, Chan CC, de Smet MD, Palestine AG, Davis JL, Whitcup SM, Burnier MN Jr, Nussenblatt RB. The role of chorioretinal biopsy in the management of posterior uveitis. *Ophthalmology* 1993 May;100(5):705-14.
8. Burnier Pereira F, Burnier MN Jr, Shibata H, Wang B, Carey W. Cytomorphometric parameters and the metastatic potential of cutaneous and uveal melanoma: a comparison with prognostic factors. *Am J Dermatopathol* 2001 Aug;23(4):304-7.