



Universidad  
de Oviedo

Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas



Universidad de Oviedo

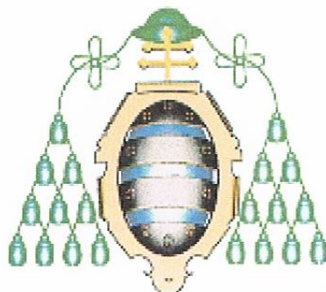
## **Programa de Doctorado: “Investigación en cirugía”**

“Perfil histológico e inmunohistoquímico del  
desarrollo del mesénquima de la extremidad del  
embrión y feto”

Javier Gosálbez García.

Oviedo 14 Marzo 2012.

**Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas**



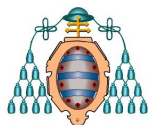
**Universidad de Oviedo**

**“Perfil histológico e inmunohistoquímico del  
desarrollo del mesénquima de la extremidad del  
embrión y feto”**

**Javier Gosálbez**

**Luis Ramos**

**Manuel Fresno**



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Estudio histológico e inmunohistoquímico del desarrollo del mesénquima de la extremidad del embrión y feto.	Histological and immunohistochemical analysis of the development of mesenchymal tissue obtained from embryos and fetuses's extremities.
2.- Autor	
Javier Gosálbez García	-
Programa de Doctorado: Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas	
Órgano responsable:	

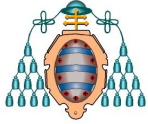
### RESUMEN (en español)

El presente trabajo de tesis doctoral se centra en el estudio del mesénquima de la extremidad de embriones y fetos obtenidos de 50 muestras procedentes de abortos recogidas del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del H.U.C.A.

Tras la clasificación de las muestras según el tamaño y edad de gestación probable, el procesamiento de los tejidos se realizó según la técnica habitual de preparación de muestras para su estudio histológico con microscopio óptico. Las tinciones se realizaron con Hematoxilina-Eosina (HxE) y ocasionalmente con Tricrómico de Masson. La utilización de la Inmunohistoquímica aplicada al mesénquima nos permite diferenciar estirpes celulares que por su morfología serían indistinguibles. Para el estudio inmunohistoquímico se seleccionaron seis embriones que representaban, por su tamaño, diferentes estadios del desarrollo embrionario. Utilizamos aquellas muestras cuyos tejidos estaban mejor conservados al ser observados con la HxE. En el apartado de la Inmunohistoquímica utilizamos cuatro grupo de marcadores tisulares: Filamentos intermedios (*Vimentina* y *Desmina*), Marcadores de diferenciación muscular (*MyoD1* y *Actina ML*), Marcadores de diferenciación endotelial (CD31 y CD34) y por último los Marcadores diferenciación neural (*S100*, *Neurofilamentos* y *Synantofisina*).

Los resultados describen la diferenciación de los tejidos derivados del mesénquima estableciendo cuatro etapas que agrupan características histológicas comunes. También pone de manifiesto como el mesénquima primitivo posee, desde el principio, células con características fenotípicas propias del tejido adulto que posteriormente formará. La presencia de marcadores inmunohistoquímicos varía a lo largo de la embriogénesis dependiendo del grado de maduración del tejido estudiado y de la especificidad del marcador utilizado.

El conocimiento del desarrollo embriológico del mesénquima desde el punto de vista histológico ayudaría a un mejor reconocimiento de las células y tejidos en diferentes fases de diferenciación. Tal conocimiento podría ser de utilidad en el campo, por ejemplo, de las terapias regenerativas y en el estudio de los Sarcomas de partes Blandas.



## RESUMEN (en Inglés)

This Doctoral Thesis is centered in the histological analysis of samples of mesenchymal tissue of extremities obtained from 50 embryos and fetuses from the archives of the Pathology Department of The Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Samples were classified according to size and probable age of gestation, and were processed according to the protocol for analysis with light microscopy. Stains used were Hematoxylin-Eosin (HxE) and occasionally Masson's Trichrome. The use of Immunohistochemistry Techniques in the mesenchymal tissues allowed us to differentiate among cellular lines that just from their histological appearance could not be distinguished. For the immunohistochemical analysis, six embryos were chosen that due to their size, should represent different stages of development. We choose those samples whose tissues were judged to be better preserved in the HxE stains. In the immunohistochemical evaluation we used four groups of tissue markers: Vimentine and Desmine of intermediate filaments. Markers of muscle development (MyoD1 and Actin ML). Markers of endothelial differentiation (CD31 and CD34) and finally markers of neural differentiation (S100, Neurofilaments and Synantofisin). The results of all the analysis established four stages in the differentiation of tissues derived from the mesenchyme, which show common histological characters. Also gives evidence that the primordial mesenchyme has from the beginning cells with phenotypes characteristic of the adult tissue in which afterwards will develop. The presence of immunohistochemistry markers changes as the embryogenical process progresses depending on the grade of maturation of the tissue studied and the specificity of the marker used. The knowledge of the histology of the embryogenic mesenchyme as it develops should help to better recognize the different cells and tissues at different stages of development. Such knowledge would be useful in fields such as regenerative therapy and Soft Tissue Sarcomas

## **AGRADECIMIENTOS.**

Para mí ha supuesto un gran reto la realización de este trabajo. Desde el principio fueron muchas las dudas que he tenido que vencer y que apunto han estado de acabar con mi paciencia. Una parte importante del mérito pertenece a todas las personas que desinteresadamente me han ayudado en la realización de la tesis y sin las cuales no hubiese sido posible su finalización. Para todas ellas, mis más sinceros agradecimientos.

De forma muy especial quiero recordar a mi madre. Su apoyo humano y técnico, ánimos y dedicación constante han sido definitivos. No habría podido acabar la tesis sin su ayuda.

Por otra parte, expresar también mi agradecimiento a los directores de esta tesis. El doctor Ramos que ha corregido minuciosamente este trabajo, dándome la posibilidad de mejorarlo. Agradecerle sus sugerencias, correcciones y capacidad de síntesis pero sobre todo gracias por su infinita paciencia y comprensión de los innumerables retrasos y tardanzas sobre los tiempos previstos. El doctor Fresno, con su gran calidad científica me ha resuelto aquellas dudas y cuestiones que surgían en cualquier momento. Además ha sido una fuente de información y referencia imprescindible.

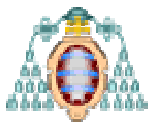
Las preparaciones de las laminillas fueron realizadas por Isabel, técnica de laboratorio del Servicio de Anatomía patológica. Mi sincero agradecimiento por su colaboración.

A mi padre por sus consejos y su ayuda en la traducción de los textos. A mi mujer Blanca y mis hijas Inés, Celia y Clara por todo el tiempo que les he robado sentándome delante del ordenador. A todos ellos, gracias.

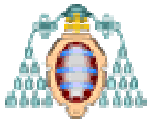


## ÍNDICE

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. DIFERENCIACION.....	1
1.2. DESARROLLO HISTOLOGICO.....	4
1.2.1. Tejido muscular.....	5
1.2.2. Tejido vascular.....	7
1.2.3. Tejido adiposo.....	9
1.2.4. Tejido nervioso.....	10
1.2.5. Tejido cartilaginoso y óseo.....	11
1.2.6. Articulaciones.....	12
1.3. TECNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	13
1.3.1. La inmunorreacción directa.....	17
1.3.2. La inmunorreacción indirecta.....	18
1.3.3. El marcaje múltiple.....	19
1.3.4. Fijación y preservación.....	19
1.3.5. Desenmascaramiento antigénico.....	20
1.3.6. Interpretación de la técnica.....	21
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	22
2.2. OBJETIVOS.....	23
2.2.1. Objetivo principal.....	23
2.2.2. Objetivo secundario.....	23
<b>3. MATERIAL Y MÉTODO</b>	
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	24
3.2. ÁMBITO DEL ESTUDIO.....	24
3.3. OBTENCIÓN DE CASOS.....	25
3.4. OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN.....	28
3.4.1. Variables estudiadas.....	28
3.4.2. Fuentes de las que se obtuvieron los datos.....	29
3.4.3. Preparación de las muestras.....	29
3.4.3.1. Estudio histológico.....	29
3.4.3.2. Estudio inmunohistoquímico.....	32
3.4.4. Anticuerpos utilizados.....	36
3.4.4.1. Filamentos intermedios.....	36
3.4.4.2. Marcadores de diferenciación muscular.....	38
3.4.4.3. Marcadores de diferenciación endotelial.....	39
3.4.4.4. Marcadores de diferenciación neural.....	40
3.4.5. Valoración de los resultados inmunohistoquímicos.....	43
3.4.6. Limitaciones del estudio.....	43



<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. RESULTADOS CON HEMATOXILINA.....	45
4.1.1. Periodo de indiferenciación.....	45
4.1.2. Periodo de diferenciación temprana.....	46
4.1.3. Periodo de diferenciación intermedia.....	49
4.1.4. Periodo de diferenciación tardía.....	53
4.2. RESULTADOS CON INMUNOHISTOQUÍCA.....	59
4.2.1. Periodo de indiferenciación.....	59
4.2.2. Periodo de diferenciación temprana.....	65
4.2.3. Periodo de diferenciación intermedia.....	71
4.2.4. Periodo de diferenciación tardía.....	81
<b>5. DISCUSIÓN</b>	
5.1. DISCUSIÓN.....	92
5.2. MARCADORES.....	100
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>112</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>113</b>



Universidad  
de Oviedo

# I. INTRODUCCIÓN



La base de nuestro trabajo es el estudio, tanto desde el punto de vista histológico como inmunohistoquímico (IHQ), del desarrollo de los tejidos mesenquimales a lo largo de la embriogénesis.

## 1.1 DIFERENCIACIÓN

La primera consideración sobre el desarrollo del embrión humano comienza con la regulación y reorganización celular que ocurre antes de la fertilización. Dichos cambios se producen en el patrón de síntesis de macromoléculas y en la organización de la estructura citoplasmática y de la membrana celular que transcurre durante la fase terminal de la oogénesis (periodo de la meiosis que precede a la ovulación). Estos cambios representan la expresión de un programa que prepara al oocito para la fertilización y posterior desarrollo. En la actualidad existen numerosas investigaciones abiertas sobre estos procesos<sup>1</sup>.

El plano corporal es generado por células y tejidos dispuestos con exactitud en lugares precisos dentro del embrión. Las interacciones celulares conllevan el establecimiento de los principales ejes corporales y controlan la organización tisular en otros órganos. Al respecto, la combinación de la embriología experimental con los recientes avances en tecnología molecular ha generado que el desarrollo de la extremidad del vertebrado sea un paradigma dentro del estudio de este proceso<sup>2</sup>.

La estructura del miembro puede ser descrita en términos de tres ejes: el eje próximo-distal, que se extiende desde el hombro hasta los dedos; el eje antero-posterior, que se extiende, por ejemplo, en la mano, desde el pulgar hasta el dedo meñique; y el eje dorso-ventral, que recorre el dorso de la mano, hasta la palma. Durante los últimos años diversos grupos de experimentación han identificado puntos clave del desarrollo de la extremidad a lo largo de estos tres ejes<sup>2-3</sup>.

En el inicio del desarrollo embrionario todas las células son iguales y, por tanto, indiferenciadas, para posteriormente formar series celulares con características determinadas diferentes unas de otras. Las células embrionarias tienen la capacidad de sentir su posición relativa en el interior de una población limitada y de diferenciarse constituyendo un tejido en particular.

A medida que progresa el desarrollo embrionario, las células van perdiendo su capacidad de diferenciarse y multiplicarse llegando el momento en que se puede decir que son células diferenciadas y específicas de un tipo de tejido concreto. Dependiendo del tejido, mantendrán cierta capacidad de regeneración, aunque casi nunca la capacidad de diferenciación en otro tejido<sup>4</sup>.

A la célula primitiva totipotencial se la denomina célula madre embrionaria ó stem cell. El desarrollo humano a partir de estas células es contrario a lo que ocurre con los tejidos adultos donde, con escasas excepciones, no son capaces de regenerarse.

En los humanos existen dos tipos de células madre: las células madres embrionarias y las células madres adultas. Mientras que aquéllas son capaces de formar diferentes tejidos, las células madres adultas sólo controlan la producción de un determinado tejido, tal y como ocurre con la célula basal de la piel, que sólo es capaz de formar tejido cutáneo.

¿Cuál es la diferencia entre la célula madre embrionaria y la adulta? ¿Cuáles son los factores que regulan el diferente modo de comportarse de unas y otras? A pesar del desconocimiento de las diferencias, hay algo claro: las células madre embrionarias pueden dar lugar a un organismo entero porque colonizan la línea germinal. Las células madre adultas se multiplican y diferencian formando un tejido en concreto pero, como no colonizan la línea germinal, pierden la totipotencialidad o, lo que es lo mismo, la capacidad para formar un organismo entero. Esta diferencia es fundamental<sup>5-8</sup>.

Por otra parte, cualquier célula puede sentir su posición relativa en el interior de una población limitada, por lo que puede organizarse en tejidos, los cuales se agrupan formando órganos y sistemas. Un campo interesante de investigación abierta en estos momentos estudia los factores que regulan el crecimiento y la diferenciación celular<sup>9-10</sup>.

También es necesario tener en cuenta la existencia de células en el individuo adulto que mantienen el potencial de regeneración, así como otras células que, una vez diferenciadas, incluso en etapas tempranas del desarrollo, pierden la capacidad de multiplicarse. Es el caso de las células cardíacas.

Actualmente se está estudiando la presencia de células madre embrionarias tanto en tejido embrionario ya diferenciado como en tejido adulto<sup>11</sup>. Estas células han sido denominadas por diferentes autores<sup>12</sup> como “células satélites”.

La denominada “desdiferenciación” es otro fenómeno de interés. Tejidos adultos diferenciados ante determinadas circunstancias pueden sufrir una metaplasia, es decir, convertirse en otro tejido. Esto presupone que células diferenciadas conserven la capacidad de las células multipotenciales, por lo que pueden transformarse en tejidos diferentes de los que habitualmente forman. Un ejemplo de esto lo constituyen los llamados ratones articulares o cuerpos cartilagosos, en donde la sinovia se convierte en tejido cartilaginoso.

Los cambios reparativos, como el tejido de granulación de las cicatrices o los cambios isquémicos musculares, dan lugar a imágenes histológicas muy semejantes a ciertos cambios morfológicos que sufre el mesénquima en etapas del desarrollo embrionario<sup>13-15</sup>.

Por todo lo anteriormente expuesto, el estudio de fenómenos de diferenciación, desdiferenciación y reparación es un importante campo de experimentación; y su estudio nos permitirá conocer mejor la embriogénesis y su relación con los cambios neoplásicos<sup>16-19</sup>.

La complejidad del proceso de diferenciación y desdiferenciación se podría entender mejor recordando la formación del mesénquima embrionario, ya que es éste uno de los sistemas que dará lugar a un mayor número de tejidos (cartílago, hueso, sinovia, tendón, fascia, músculo, tejido vascular, tejido adiposo, tejido conectivo, etc.).

## **1.2 DESARROLLO HISTOLOGICO**

Sobre el desarrollo del embrión humano existen muchos textos y conocimientos de aspectos puramente anatómicos desde el estadio de mórula, gástrula, embrión y feto al nacimiento. No obstante, existe poco publicado sobre los cambios histológicos que sufren los tejidos y órganos a través de la vida embrionaria y, puesto que a partir del mesénquima se formarán un gran número de tejidos adultos distintos, su estudio puede servir para, en cierto modo, entender el fenómeno de la diferenciación.

Hertwing, en 1941, introdujo el término mesénquima, señalando que en un principio las células de cada una de las capas embrionarias eran iguales y que más tarde cada grupo de células se organizaba en tejidos específicos, dando lugar a diferentes órganos y sistemas.

El término mesénquima engloba a todo el mesodermo no epitelial indiferenciado de los embriones, del que derivan:

1. El epitelio de las gónadas y sus ductos, los riñones y sus ductos, y la parte cortical de la glándula suprarrenal.
2. El mesotelio que tapiza las cavidades celómicas (pleura y peritoneo).
3. El mesénquima, que es el precursor del tejido conectivo, vascular, esquelético, muscular, adiposo y hematopoyético.

Las extremidades están formadas, en su mayoría, por tejidos procedentes del mesénquima. Un modo de estudiarlo es observar los cambios histológicos que sufren los tejidos de las extremidades en los embriones.

La yema de las futuras extremidades aparece entre la 3ª y la 4ª semana de vida embrionaria como una proyección de la parte dorsal de la somatopleura, algo ventral a los somitas el de las extremidades superiores y un poco más caudal el de las inferiores<sup>20</sup>. Cada yema consiste en un mesénquima histológicamente indiferenciado cubierto por células de origen ectodérmico. La diferenciación de este mesénquima comienza en la parte proximal y se extiende distalmente a medida que el miembro se elonga.

Factores de tipo genético, ambiental, factores de crecimiento como la proteína morfogenética ósea (BMP), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), entre otros, promueven la formación de los diferentes tejidos adultos. La suma de estos factores coordina la morfogénesis de las extremidades<sup>2-3,21-23</sup>.

Según avanza la embriogénesis aparecen células con rasgos de diferenciación, como condroblastos, mioblastos, angioblastos, osteoblastos, fibroblastos y adipoblastos. Estas células presentan características histológicas propias del tejido adulto que posteriormente formarán.

### **1.2.1 Tejido muscular**

Durante muchos años se pensó que la musculatura esquelética del cuerpo, excepto la de los arcos branquiales, procedía de los miotomos paravertebrales; y que los músculos del cuerpo, incluyendo los de las extremidades, se formaban por migración de células procedentes de dichos miotomos. Posteriormente se comprobó que el músculo de las extremidades procedía del mesénquima local y no de la migración de las células miotomales paraaxiales<sup>15</sup>.

Las yemas del embrión, que luego darán lugar a los miembros, inicialmente están formadas por células de núcleos redondos u ovals, con escaso citoplasma y marcado monomorfismo celular. Posteriormente se transforman en mioblastos ó células pequeñas, redondas o fusiformes mononucleadas, con un nucléolo prominente e intensa actividad mitótica<sup>3,24</sup>. Por fusión o por mitosis, los mioblastos forman miotúbulos, que es el paso siguiente en la miogénesis<sup>25-26</sup>.

Entre cada grupo de células musculares se pueden observar agregados de células intersticiales o pequeñas células sin diferenciación aparente. Los miotúbulos difieren de los mioblastos por ser células multinucleares y por la presencia de filamentos citoplasmáticos depositados inicialmente en el eje central del miotúbulo. El núcleo se va desplazando periféricamente a medida que se va formando más proteína contráctil, cuya presencia se inicia en este estadio del desarrollo<sup>1,24,25,27-28</sup>. En resumen, los estadios de diferenciación del músculo esquelético son:

1. Transformación de células mesenquimales indiferenciadas redondas en mioblastos mononucleares alargados con núcleo granular.
2. Fusión de los mioblastos en miocitos sincitiales ó miotúbulos, formando células multinucleadas.
3. Síntesis de miofilamentos, que se integran como miofibrillas.
4. Crecimiento de los miotúbulos con formación de miofilamentos adicionales.
5. Organización funcional de los miofilamentos en miofibrillas y en sarcómeras con actividad contráctil.
6. Desarrollo de la sinapsis neuromuscular.

### 1.2.2 Tejido vascular

Hacia la mitad de la tercera semana del desarrollo embrionario, las células mesodérmicas situadas en el mesodermo esplácnico, a cada lado de la línea media y por delante de la lámina precordial, se convierten por diferenciación en células que originan sangre y vasos sanguíneos<sup>27</sup>. Estas células, llamadas *angioblastos*, forman acúmulos y cordones aislados (islotos celulares angiogénicos), que gradualmente experimentan canalización por confluencia de hendiduras intercelulares. Las células centrales originan las células sanguíneas primitivas y las periféricas se aplanan formando las células endoteliales que revisten los islotos de hemangioblastos o islotos sanguíneos<sup>28</sup>. Los islotos de hemangioblastos se acercan rápidamente por gemación de las células endoteliales y, después de fusionarse, originan vasos de pequeño calibre. Para la formación de vasos es necesario que se generen gran número de células endoteliales y que éstas se ensamblen de manera que puedan organizarse y dar lugar al patrón vascular de todo el organismo.

Además de las células endoteliales que contornean la luz, en los vasos existen células de músculo liso y pericitos.

Durante la maduración de los vasos sanguíneos, una capa de células musculares lisas primitivas (pericitos) rodea los canales tapizados por células endoteliales, contribuyendo a su diferenciación y proliferación, además de controlar el “estatus” vasomotor y dar soporte estructural al vaso. Las células mesenquimales vecinas al capilar se organizan y diferencian en una capa muscular media y una más superficial llamada adventicia.

Las células endoteliales son específicas de los vasos sanguíneos, mientras que las células del músculo liso y los pericitos forman parte de otros tejidos<sup>29-30</sup>.

La angiogénesis embrionaria está regulada por la secreción de factores angiogénicos que inducen la proliferación y migración de la célula endotelial. La

matriz extracelular restaura dichos factores angiogénicos y posee propiedades inhibitoras e inductoras del flujo sanguíneo y hemodinámica. Por lo tanto, modificará y dirigirá la estructura del sistema vascular. Un papel importante es la presencia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), necesario para la formación de vasos inmaduros<sup>31-32</sup>.

Alrededor de la 4ª semana, los embriones humanos poseen un sistema vascular bien formado, desarrollado a partir de los plexos capilares. Su desarrollo y diferenciación, entre otras cosas, depende de los factores mecánicos a los que esté sometido el tejido donde asientan.

En resumen, los estadios de la angiogénesis son:

1. Presencia de células endoteliales procedentes de células mesenquimales.
2. Ensamblaje de las células endoteliales con formación de redes de microvascularización.
3. Gemación y ramificación de dichas redes.
4. Presencia de células de músculo liso y pericitos periendotheliales.
5. Establecimiento del patrón vascular de arterias y venas.



### 1.2.3 Tejido adiposo

El origen del tejido adiposo ha sido fruto de diferentes postulados. Puesto que existe una importante asociación entre los capilares y los adipocitos, existe la teoría de que la célula endotelial sea la precursora del *adipoblasto*<sup>30-33</sup>. También se ha mencionado como un posible origen a las células reticulares perivasculares (fibroblast-like perivascular). Otra teoría sobre la histogénesis de la grasa es que el adipoblasto proceda directamente de una célula mesenquimal indiferenciada, pluripotencial y perivascular<sup>34</sup>. Esta teoría es la más aceptada en la actualidad.

En cualquier caso, en el desarrollo del tejido adiposo podemos observar al microscopio 4 fases ó estadios:

1. Células indiferenciadas que, inducidas por una determinada señal desconocida, se transforman en preadipocitos. El futuro tejido adiposo se caracteriza, en esta primera etapa, por presentar células de núcleos fusiformes embebidas en una matriz más o menos mixoide sin características diferenciales.
2. Alrededor de la semana catorce existen agregados de células fusiformes que se sitúan alrededor de los vasos primitivos, formando los preadipocitos o células más o menos estrelladas que no contienen vacuolas
3. Los capilares continúan proliferando, formando una rica red vascular alrededor de la cual los preadipocitos se organizan en lóbulos mesenquimales.
4. Los preadipocitos se llenan de finas vacuolas citoplasmáticas y continúan proliferando los lóbulos integrados por células vacuoladas.

5. En esta fase existe una condensación del mesénquima perilobular, dando lugar a la formación de septos interlobulares de tejido fibroso.

Los estadios mencionados ocurren desde la semana catorce a la veinticuatro de gestación. De la veinticuatro a la veintinueve, el número de lóbulos adiposos es constante y el crecimiento del tejido adiposo es debido a la proliferación de los capilares y los adipocitos. Alrededor de la semana veintitrés una capa de grasa subcutánea está presente en toda la extremidad<sup>27</sup>.

#### **1.2.4 Tejido nervioso**

El sistema nervioso central del embrión aparece hacia el comienzo de la tercera semana a partir de ectodermo engrosado: la placa neural. Los bordes laterales de esta placa se elevan y forman los pliegues neurales, los cuales circunscriben una depresión llamada surco neural que posteriormente se cierra formando el tubo neural. La pared del tubo neural consiste en un tipo celular: las células neuroepiteliales. Estas se dividen rápidamente para continuar produciendo otro tipo celular, de núcleo redondo voluminoso, nucleoplasma pálido y nucleolo que se tiñe de oscuro. Estas células son los neuroblastos o células nerviosas primitivas. Al continuar la diferenciación, los neuroblastos emiten prolongaciones citoplasmáticas y se diferencian en la célula nerviosa adulta o neurona. Los neuroblastos, una vez formados, pierden su capacidad de dividirse. La prolongación de un extremo de la célula crece rápidamente y forma el cilindroeje primitivo que, al salir de la médula, formará conjuntamente con otros la raíz motora del nervio raquídeo.

Los ganglios sensitivos o de la raíz posterior de los nervios periféricos provienen de las crestas neurales, acúmulos de células de origen ectodérmico a cada lado del surco neural. Los neuroblastos de los ganglios sensitivos presentan dos prolongaciones: una centrípeta hacia la médula (asta posterior) y otra centrífuga que se une a las fibras de la raíz motora. Ambas se unen y forman el tronco del nervio raquídeo.

La mielinización de los nervios periféricos depende de las células de Schwann, que proceden de las crestas neurales, emigran periféricamente y se disponen alrededor de los cilindroejes formando el neurilema<sup>35-37</sup>.

### **1.2.5 Tejido cartilaginoso, óseo y articular**

El cartílago es uno de los primeros tejidos que aparece en los embriones. La condricación comienza en determinadas áreas del mesénquima de la futura extremidad, aproximadamente cuando el tamaño del embrión es de 1 cm. Es decir, entre la cuarta y la quinta semana de gestación. Esta comienza con la formación de los centros precondrales, compuestos por células mesenquimales separadas por matriz intercelular fluida. Este tejido precartilaginoso pronto se convertirá en tejido cartilaginoso embrionario de matriz basofílica.

Conforme el tejido madura, disminuye la concentración de células y aumenta el volumen y la condensación de la matriz, separando unas células de otras, bien de modo aislado o formando pequeños grupos celulares<sup>38</sup>.

El crecimiento del cartílago se realiza por la transformación en tejido condroide de las capas profundas del mesénquima pericondral. En el embrión humano de siete semanas, la condricación está muy avanzada y cada hueso está representado por su rudimento cartilaginoso<sup>27,39-40</sup>.

En resumen, en la formación del tejido condral observaremos:

1. Cono de condensación de mesénquima en las extremidades.
2. Aparición de centros precondrales en el cono (células mesenquimales separadas por matriz fluida).
3. Aparición de centros cartilaginosos (células condroides con matriz basofílica).

4. Aumento de la matriz y disminución del número de células
5. Separación de células individualmente o en pequeños grupos por condensación de la matriz.
6. Calcificación del cartílago.
7. Sustitución del cartílago osificado por hueso.

En la osificación o formación de hueso debemos recordar que ésta puede ser intramembranosa, es decir, proceder directamente de áreas de condensación del mesénquima embrionario; o endondral, es decir, reemplazando al cartílago precursor. En la osificación endondral el papel del osteoclasto es importante en la destrucción del cartílago calcificado.

### **1.2.6 Articulaciones**

En los embriones de cinco semanas, el blastema de las articulaciones está presente en un cono de mesénquima condensado y es en él donde se desarrollan los centros precondriales. Posteriormente aparecen los rudimentos de la futura articulación y el mesénquima indiferenciado se transforma en sinovia, cápsula, meniscos y ligamentos interarticulares.

Al principio de la séptima y octava semanas comienza la aparición de la cavidad articular por licuefacción mucoide del mesénquima. La membrana sinovial se forma en la periferia de la cavidad articular y el cartílago articular aparece opuestamente en la cara central de ella. La sinovia y el cartílago articular son continuos, siendo muy difícil diferenciarlos e incluso separarlos del pericondrio y la cápsula articular en los primeros momentos de su génesis.

Hacia la octava semana, muchos de los tendones, ligamentos y fascias están presentes por condensación mesenquimal, pero no es hasta después del nacimiento cuando las articulaciones están bien constituidas<sup>41-42</sup>.

En resumen, en el aparato articular podemos distinguir:

1. Licuefacción del mesénquima alrededor de centros cartilaginosos y formación de cavidad articular (7<sup>a</sup>-8<sup>a</sup> semana).
2. Formación de membranas sinoviales del mesénquima de la cavidad.
3. Condensaciones de mesénquima (8<sup>a</sup> semana) y formación de tendones, ligamentos, fascias, etc.

Los cambios metaplásicos originados en la articulación (ratones intraarticulares) pueden ser entendidos por el origen común de la sinovia y el cartílago articular.

### **1.3 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS**

Ante cualquier estudio histopatológico de rutina, la técnica habitual de tinción es la Hematoxilina-Eosina (HxE). Esta técnica permite diferenciar las estructuras ricas en ácidos (núcleos celulares) con afinidad por la hematoxilina, que es un colorante básico, de los componentes celulares ricos en bases (componentes citoplasmáticos y fibras), que se tiñen con la eosina, que es un colorante ácido. Este método de tinción tiene el inconveniente de no distinguir entre las diferentes bases y de tampoco mostrar componentes celulares no visibles con el microscopio de luz. Por este motivo y para mejorar las limitaciones de la HxE, con cierta regularidad se aplican técnicas especiales como son la histoquímica, la microscopía electrónica y, más recientemente, la IHQ.

La IHQ es la aplicación de principios y técnicas de inmunología al estudio histopatológico. Se basa en la reacción antígeno-anticuerpo con revelado posterior y su objetivo es utilizar diferentes anticuerpos para identificar antígenos específicos que permitan caracterizar la estirpe y otras características celulares.

El desarrollo de las nuevas técnicas para la conexión de la inmunología con la histopatología se inició con Coons, que observó la posibilidad de demostrar antígenos en los tejidos mediante anticuerpos marcados con fluoresceína. Con la introducción de compuestos estables de fluoresceína isotiacina (FITC), en 1961, preparó conjugados de FITC y dio nacimiento a la “técnica del anticuerpo marcado con fluoresceína”<sup>43- 44</sup>.

Durante los siguientes años, los métodos de inmunofluorescencia se aplicaron a diferentes campos de la investigación, demostrándose antígenos específicos en tejidos y células, con un gran avance en la inmunología e histopatología<sup>44</sup>.

La inmunofluorescencia presenta el inconveniente de tener que ser realizada sobre tejidos frescos congelados, con un equipamiento especial, así como la imposibilidad de obtener preparaciones permanentes. Esto determinó la búsqueda de métodos alternativos.

En principio, se introdujo la técnica IHQ de un anticuerpo unido a la ferritina, ya que ésta podía ser visualizada con el microscopio electrónico. No obstante, la técnica presentaba el inconveniente de poseer poca penetración en los tejidos debido al enorme tamaño de la molécula de ferritina conjugada (de peso molecular 650.000), así como la necesidad de precisar de un microscopio electrónico para su visualización.

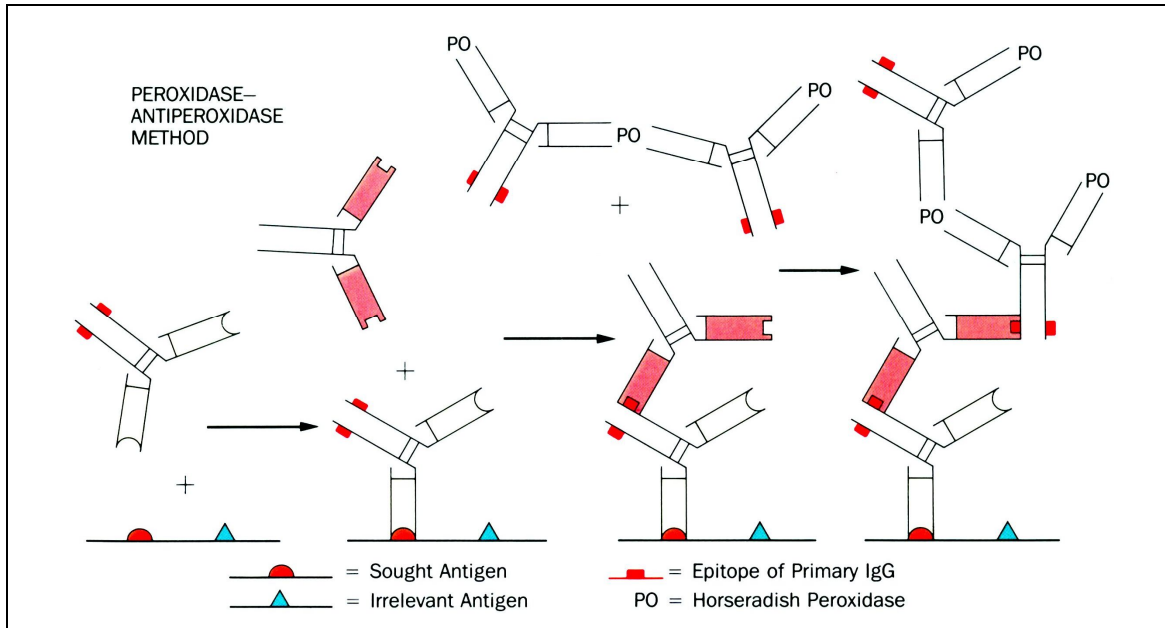
La idea del marcaje de los anticuerpos con ciertas enzimas, para cuyo revelado e identificación la histoquímica dispone de métodos razonables, dio mejores resultados y amplió los campos de la inmunohistoquímica<sup>45</sup>. La primera enzima ensayada fue la fosfatasa ácida, seguida de la peroxidasa de rábano

(horseradish peroxidase), la cual, por su simplicidad, fue la más utilizada durante mucho tiempo<sup>46-47</sup>.

El método peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) consiste en el acoplamiento de los anticuerpos en estudio a la enzima (peroxidasa), la cual transforma el sustrato incoloro en sustancias insolubles coloreadas que precipitan sobre la posición de la enzima en el corte histológico y nos indican, de modo indirecto, dónde están situados el anticuerpo y el antígeno que queremos determinar. En caso de no producirse la reacción antígeno-anticuerpo (por falta de antígeno específico al anticuerpo utilizado), en los lavados que siguen a la incubación se marcha el complejo anticuerpo-enzima y, al revelar la muestra con el sustrato, como no hay enzima en el tejido, no se colorea la muestra<sup>48</sup>.

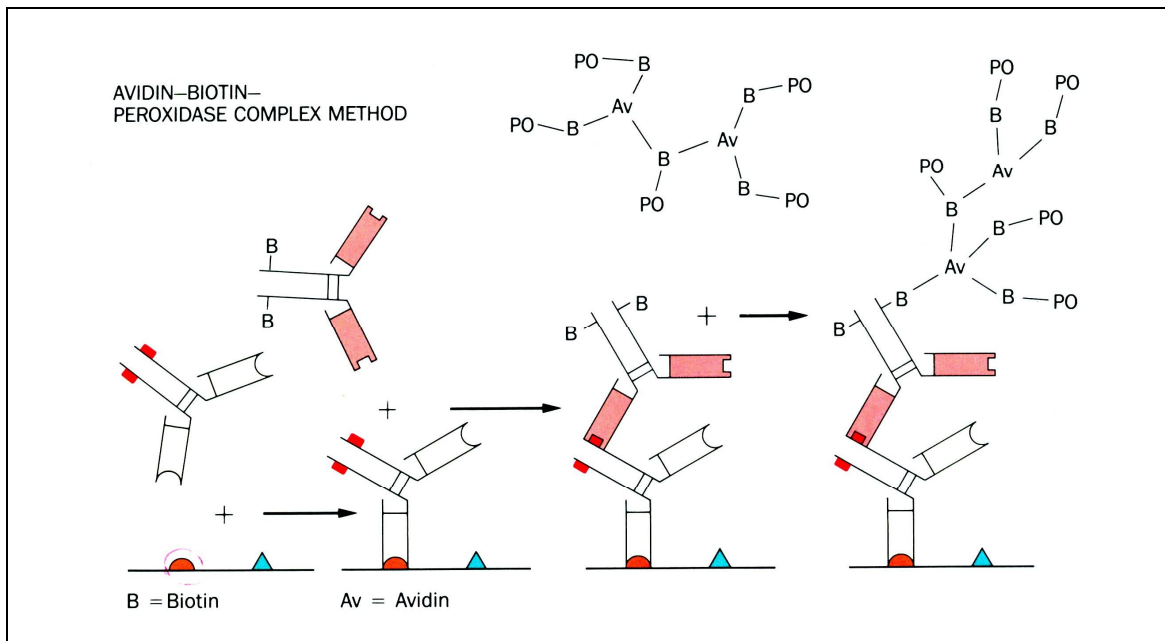
Puesto que la enzima más utilizada fue la peroxidasa de rábano, se conoce a este método como "técnica de inmunoperoxidasa". Otras enzimas, como las fosfatasas alcalinas, han sido utilizadas con menos frecuencia.

En todos los métodos IHQ, las señales indicativas del depósito "antígeno-anticuerpo-enzima" pueden ser aumentadas, es decir, hechas fácilmente visibles al microscopio. Para ello se ha utilizado la llamada "técnica de sándwich", cuyo principio es el siguiente: en vez de unir la peroxidasa de rábano a un anticuerpo específico (anticuerpo primario), la enzima se une a un segundo anticuerpo creándose un anti-anticuerpo que se une al primer anticuerpo no marcado (Figura 1).



**Figura 1. Método peroxidasa-antiperoxidasa.**

Otras técnicas posteriormente utilizadas fueron la de la avidina-biotina y la de la estreptavidina, que utilizan antibióticos como enzimas de unión (Figura 2) <sup>49</sup>.



**Figura 2. Método Avidina-Biotina.**



A partir de los años 80 se han desarrollado sistemas automatizados que facilitan la uniformidad en las condiciones de reacción y, por lo tanto, la estandarización de la técnica.

La automatización de la técnica hace que, al ser el método más simple y reproducible, se haya convertido en una parte esencial de la patología quirúrgica. Actualmente este método ha sustituido, en cierta medida, al microscopio electrónico, cuyo procedimiento es mucho más laborioso, necesita un utillaje más complejo y no está disponible en la mayoría de los laboratorios.

La IHQ, además de permitir el diagnóstico y reconocimiento de diferentes estirpes celulares, se utiliza para el establecimiento de factores pronósticos, como la valoración del índice proliferativo y la presencia de oncogenes. También facilita la elección de ciertos tipos de tratamientos (receptores hormonales, Herceptin®).

El gran aumento de la comercialización de anticuerpos específicos ha sido determinante en la universalización de la técnica, tanto en el terreno del diagnóstico como en el de la investigación<sup>45</sup>. Es importante, por otra parte, antes de utilizar la IHQ, tener conocimientos de algunos de los conceptos y bases particulares de ella.

### **1.3.1 Inmunoreacción directa**

La inmunoreacción directa es el método más sencillo de detección antigénica. El anticuerpo primario se conjuga directamente con una molécula trazadora, generalmente fluorocromos como la fluoresceína o la rodamina. Sus inconvenientes son que el material ha de estar congelado y, además, la luz ultravioleta no permite la valoración morfológica. Por ello, se utiliza casi exclusivamente en el estudio de depósitos inmunes en riñón y piel. También puede usarse como marcador la peroxidasa, una enzima que en presencia del cromógeno adecuado permitirá el revelado de la reacción bajo microscopía óptica. Los cromógenos más usados son la diaminobenzidina, que confiere un

color marrón, y el ethylcarbazol, que lo confiere rojo. Este método es poco sensible, siendo preferible utilizar la inmunorreacción indirecta.

### 1.3.2 Inmunorreacción indirecta

La inmunorreacción indirecta amplifica la reacción antígeno-anticuerpo mediante pasos intermedios y, por tanto, aumenta su sensibilidad. Los cortes histológicos se incuban en un primer paso con el anticuerpo primario no conjugado. Posteriormente se enfrentan a un anticuerpo secundario conjugado y específico para el primario. Finalmente se revela la reacción en presencia del cromógeno.

Para reforzar la coloración final se han ideado dos sistemas: peroxidasa anti-peroxidasa y avidina-biotina (Figuras 1 y 2).

En el sistema PAP se utilizan complejos solubles formados por tres moléculas de peroxidasa y dos anticuerpos anti-peroxidasa. Estos complejos se unen al anticuerpo primario no conjugado mediante un anticuerpo puente. Si existe mucho antígeno y anticuerpo primario, el puente puede bloquearse con el primario, por lo que es preciso aplicar el secundario en exceso. Este método es de 100 a 1000 veces más sensible que el método indirecto simple<sup>47,48</sup>. De la misma manera, también pueden formarse complejos de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina que tienen las mismas aplicaciones.

El sistema avidina-biotina se basa en la marcada afinidad de la glucoproteína avidina por la biotina<sup>49</sup>. Esta característica se usa para unir la peroxidasa al anticuerpo primario o secundario. La avidina está compuesta por cuatro subunidades con una estructura terciaria que posee cuatro puntos de unión con la biotina. La carga de la avidina y la presencia de residuos de carbohidratos le confiere cierta afinidad para algunos componentes titulares, como las lecitinas, lo que puede dar lugar a tinción inespecífica. Por ello se usa la estreptavidina, con punto isoeléctrico neutro y sin carbohidratos.

La biotina se conjuga con el anticuerpo secundario que se une al primario. Se añade entonces la avidina, que puede estar marcada directamente por la peroxidasa, o bien se usan complejos de avidina-biotina marcados con peroxidasa. En cualquier caso, como se pueden unir un gran número de moléculas de biotina a un único anticuerpo, se obtiene un marcaje muy intenso, lo que le confiere una gran sensibilidad y permite diluir el antisuero primario. En la actualidad se utiliza el sistema En Vision Peroxidasa DAB conejo/ratón, cuyo fundamento se basa en la afinidad de cargas electroestáticas<sup>50</sup>.

### 1.3.3 El marcaje múltiple

La disponibilidad de varios cromógenos para una determinada enzima con una coloración distinta como producto de reacción final permite localizar diferentes antígenos en una misma preparación. En estos casos, para evitar reacciones cruzadas, es preferible utilizar anticuerpos primarios de diferentes especies de animales o de diferentes subclases.

### 1.3.4 Fijación y preservación tisular

El fijador ideal debería reunir las siguientes condiciones:

1. Adecuada preservación morfológica.
2. No destruir la inmunorreactividad del antígeno
3. Prevenir la extracción, difusión o desplazamiento del antígeno.

El método que mejor preserva la antigenicidad es la congelación rápida con fijación posterior de los cortes en alcohol o acetona. Sin embargo, la calidad morfológica es mala. El tejido ha de recibirse en fresco y la pieza ha de conservarse a -70°. Por todo ello es preferible utilizar fijadores que conserven tanto la morfología como la estructura antigénica.

Existen tres tipos principales de fijadores: alcoholes, fijadores mercuriales y aldehídos. Los alcoholes (etanol y metanol) fijan por coagulación y son óptimos para grandes proteínas, pero no para las pequeñas. Los mercuriales (B5 y líquido de Zencker) preservan bien la morfología, especialmente la nuclear, y conservan las proteínas de superficie, pero son malos para el citoesqueleto. Los aldehídos incluyen el formaldehído y el glutaraldehído. El primero es el fijador que se usa de rutina. Conserva tanto la morfología como la inmunorreactividad. Sin embargo, es preciso liberar los anticuerpos mediante digestión proteolítica previa o mediante calor, ya que induce la fijación por formación de enlaces covalentes entre las proteínas. El formol ha de estar tamponado con buffer fosfato a un pH de 7,2 y el tiempo de fijación debe limitarse a 24 horas debido a que la acidez y la prolongación en la fijación reducen la inmunorreactividad.

### 1.3.5 Desenmascaramiento antigénico

La fijación con formol induce el establecimiento de enlaces covalentes entre las proteínas, las cuales forman una malla a modo de gel. Aunque no varía la estructura secundaria ni terciaria de las proteínas ni, por tanto, los epítomos de las moléculas antigénicas, la red enmascara los determinantes antigénicos. Huang, en 1976, propuso el método de desenmascaramiento antigénico mediante procedimientos enzimáticos con proteasas<sup>51-52</sup>.

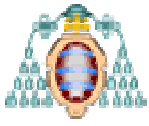
Las proteasas más usadas son la tripsina, la pepsina y la pronasa; y sus resultados varían según el tiempo de actuación, la concentración, el pH y el tiempo de fijación. Además, la cantidad de anticuerpos que se beneficia es escasa. En 1991, Shi introdujo el calor como sistema para recuperar los antígenos enmascarados<sup>53-54</sup>. La gran mejora en intensificación de la reacción, el aumento del número de anticuerpos que se puede usar sobre material fijado en formol, el fácil manejo y la estandarización hicieron que este método se convirtiera en el más usado.

Como fuente de calor puede usarse el horno microondas, la olla a presión, el autoclave, esterilizadores de biberones o vaporizadores de alimentos. Las soluciones de desenmascaramiento (tampón en el que se introducen las preparaciones para evitar su secado) son muy variadas: agua destilada, Tris, EDTA, cloruro de magnesio y cloruro sódico<sup>55-56</sup>. Aunque no existe un tampón ideal, el citrato sódico (10 mM a PH 6-7) presenta los mejores resultados<sup>57-58</sup>.

### 1.3.6 Interpretación de la técnica

Los resultados de la IHQ han de ser evaluados siempre en conjunción con los hallazgos morfológicos y los datos clínicos<sup>59-60</sup>. Es preferible el uso de un panel restringido de antisueros a un único anticuerpo y el estudio debe de hacerse en presencia de controles positivos, tanto internos como externos. Para la interpretación hay que tener en cuenta la distribución subcelular de la inmunorreactividad (por ejemplo, el CD45 marca la membrana mientras que los receptores estrogénicos se localizan en el núcleo).

Como medida de preservación antigénica de los tejidos, se aconseja valorar la expresión de vimentina<sup>61</sup>. Finalmente, hay que recordar que pueden producirse tanto falsos negativos como falsos positivos. Los falsos negativos ocurren por pérdida antigénica secundaria a autólisis o difusión, por niveles insuficientes de antígeno para su detección o por desnaturalización del anticuerpo. Los falsos positivos se dan por fijación inespecífica de los anticuerpos primarios o secundarios a receptores Fc. También por fijación inespecífica del cromógeno por las cargas electrostáticas del tejido. Esto se puede evitar añadiendo caseína, la cual satura las cargas negativas del corte histológico, o bien usando estreptavidina en lugar de avidina.



## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2.1. HIPOTESIS DE TRABAJO

El desarrollo embrionario es el período que transcurre entre la fecundación y el nacimiento de un nuevo ser<sup>62-63</sup>. Algo tan trascendente como es la histología embriológica humana, sin embargo, está poco estudiada en la profesión médica. De hecho, los profesionales que más se interesan por el desarrollo histológico de los tejidos, aunque en especies animales, son los biólogos<sup>64-65</sup>.

El estudio del mesénquima desde el punto de vista histológico ayudaría a reconocer mejor las células y tejidos en diferentes fases de diferenciación, desde la célula madre indiferenciada hasta la adulta especializada. Tal conocimiento podría ser de utilidad en el campo, por ejemplo, de las terapias regenerativas<sup>66-69</sup> o, incluso, en la oncología. Al respecto, en los sarcomas de partes blandas (SPB), por ejemplo, siendo un grupo heterogéneo de neoplasias malignas con origen común a partir de tejidos procedentes del mesénquima embrionario<sup>70</sup> y no estando claramente definido el papel de los diferentes tipos histológicos, profundizar en el desarrollo embrionario podría ser de gran utilidad pronóstica y terapéutica.

Dado que los referidos tumores se asemejan en muchos casos a tejidos primitivos derivados del mesénquima, el estudio del desarrollo de la extremidad fetal con las técnicas específicas<sup>71-73</sup> podría explicar algunos aspectos de la patogenia de la enfermedad o, al menos, mejorar su clasificación histopatológica<sup>74</sup>.

Con todo, la intención de nuestro trabajo fue el estudio, tanto desde el punto de vista histológico como inmunohistoquímico, de los tejidos de la extremidad fetal en momentos diferentes de maduración. Nuestra hipótesis de trabajo fue que el desarrollo del mesénquima acontece con cambios morfológicos e inmunohistoquímicos secuenciales en relación con la adquisición de marcadores específicos.

## **2.2. OBJETIVOS**

### **2.2.1. Objetivo principal**

1. Determinar la utilidad de la inmunohistoquímica para diferenciar los tejidos derivados del mesénquima.

### **2.2.2. Objetivos secundarios**

2. Agrupar los cambios histológicos que se producen en los tejidos derivados del mesénquima durante el desarrollo de la extremidad en etapas o periodos con características comunes que faciliten el estudio de la embriogénesis.
3. Describir los cambios histológicos que se producen en los tejidos derivados del mesénquima durante el desarrollo de la extremidad en la embriogénesis.
4. Describir la expresión de los diferentes marcadores inmunohistoquímicos que se producen en los tejidos derivados del mesénquima durante el desarrollo de la extremidad en la embriogénesis.





### **III. MATERIAL Y MÉTODO**

### **3. 1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Realizamos un estudio anatomopatológico descriptivo, observacional, transversal y retrospectivo sobre bloques y laminillas de muestras de abortos de embriones y fetos para conocer los cambios morfológicos e inmunohistoquímicos (relativos a la adquisición de anticuerpos) que acontecen durante la diferenciación del mesénquima.

### **3. 2. ÁMBITO DEL ESTUDIO**

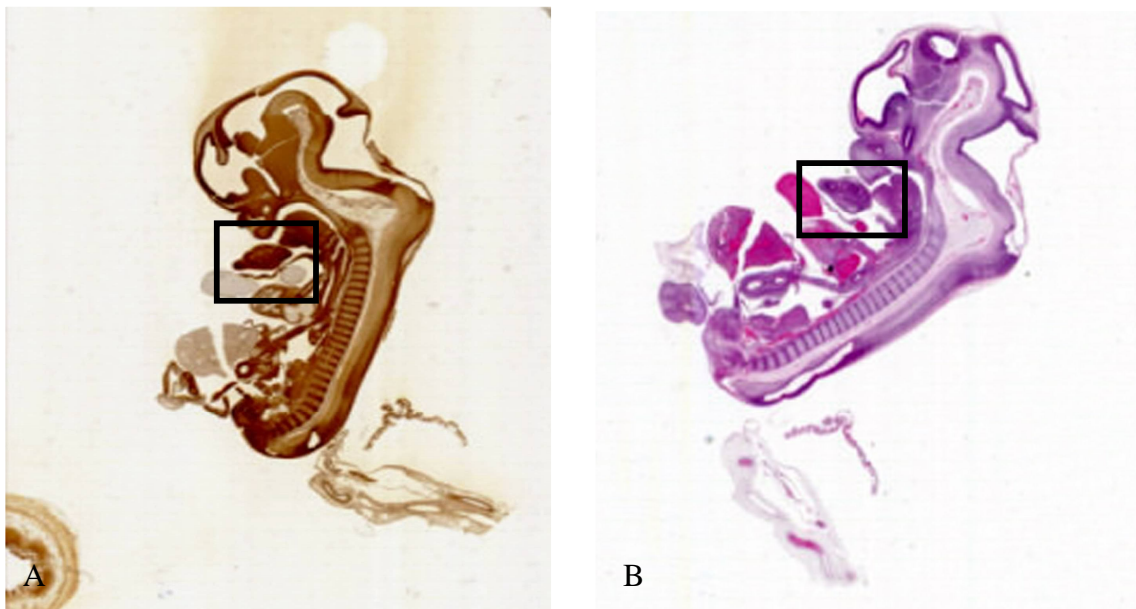
Las poblaciones estudiadas fueron las siguientes:

1. **Población de referencia:** muestras procedentes de abortos de embriones y fetos transformadas en bloques de parafina.
2. **Población accesible:** muestras procedentes de abortos de embriones y fetos remitidos con hoja de petición de estudio anatomopatológico desde el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Central de Asturias (HUCA) al de Anatomía Patológica del mismo Hospital.
3. **Población en estudio (material):** 42 muestras de embriones y fetos obtenidos de abortos y transformados en bloques de parafina durante el periodo de tiempo comprendido entre el año 1978 y el 2007. Durante este tiempo, el número total de muestras analizadas en diferentes estadios madurativos del mesénquima fue de 52. Diez muestras fueron excluidas del trabajo tras realizar la tinción con hematoxilina-eosina por presentar condiciones inadecuadas de preservación del tejido, haciendo imposible su estudio histológico.

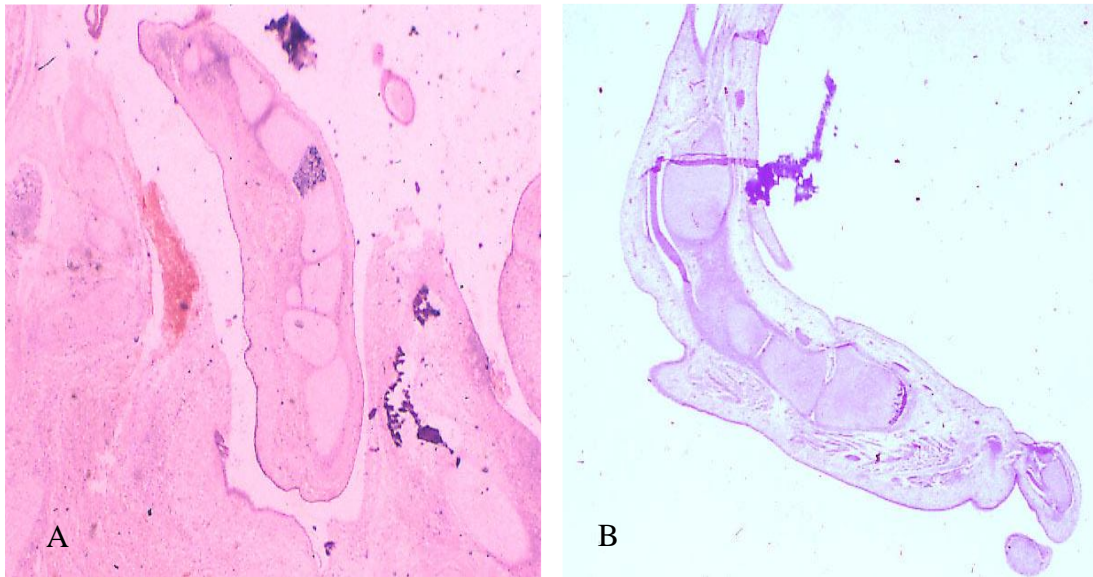
### 3. 3. OBTENCIÓN DE LOS CASOS

Los casos del estudio, en forma de bloques y laminillas, se obtuvieron e identificaron de forma continua de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias. Cuando llegaban a aquel Servicio todos los embriones y fetos se medían longitudinalmente (cráneo-talón) y se reseñaba en la descripción macroscópica su tamaño en centímetros, el sexo y si poseían externamente alteraciones macroscópicas relevantes. La edad se expresó en semanas de gestación, aunque este dato fuera aproximativo dado que dichas semanas no estaban constatadas en la mayoría de las historias clínicas. Por tal motivo se utilizó como referencia el tamaño fetal<sup>75</sup>.

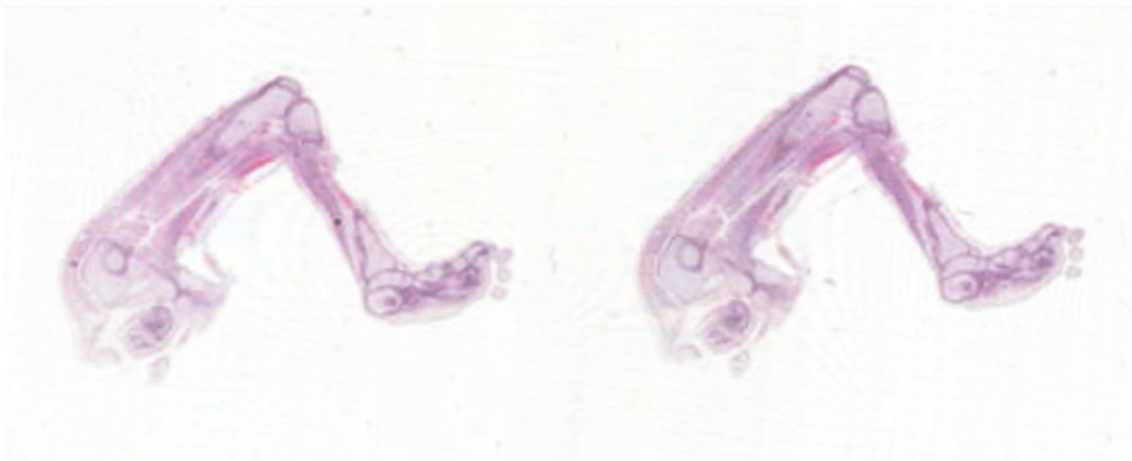
Los embriones menores de 5 centímetros ( $n = 11$ ) se incluyeron en su totalidad, mientras que en los mayores de ese tamaño ( $n= 31$ ) se tomaron secciones transversales y longitudinales de la extremidad superior e inferior para ser estudiadas.



**Figura 3.** (A) Embrión de 1.5 cm, incluido para estudio en su totalidad. Tinción con Vimentina. (B) Mismo embrión con Hx&E. En el rectángulo se encuadra la extremidad superior del embrión.



**Figura 4.** (A) y (B). Secciones longitudinales de las extremidades superiores de fetos mayores de 5 cm, incluidos para estudio en su totalidad. Tinción con HxE.



**Figura 5.** Secciones longitudinales de las extremidades inferiores de un feto de 11 cm, incluidas para estudio en su totalidad. Tinción con HxE.

El número de bloques para estudio histológico fue de uno (embriones incluidos en totalidad) o dos, cuando se tomaba la representación de ambas extremidades. En la siguiente tabla se representa el nº de casos estudiados por orden de tamaño y la edad aproximada<sup>75</sup>. En las filas sombreadas se incluyen las preparaciones en las que se ha realizado estudio con IHQ.



Nº DE ORDEN	Nº DE BIOPSIA	CM	SEMANAS
1	97	1	5-6
2	2606	1.5	6
3	1740	1.5	6
4	915 4	1.5	6-7
5	2654	2	7
6	2056	2.5	8
7	1893	3	8
8	4771	3	8
9	1239	3.5	8
10	2576	4	9
11	1648 4	4	9
12	3498	5	9-10
13	2778	5.5	9-10
14	1582	6	9-10
15	2371	6	10
16	2032	7.5	10-11
17	15.842	7.5	10-11
18	22	9	11
19	59	9	11
20	2439	10	11-12
21	2101	10	11-12
22	1390	10	11-12
23	87.2	10	11-12
24	181	11	12
25	2413	12.5	13
26	1646	12.5	13
27	1941	13	13
28	2536	13.5	14
29	2385	13.5	15
30	2718	14	16
31	2213	14	16
32	740	17	17
33	3039	18	18-19
34	18 75 32	18	18-19
35	1917	18	19-19
36	2695	19	20
37	1690	19	21
38	1443	20	21
39	2854	20	21
40	2270	28	29-30
41	1943	28	29-30
42	N91	28	29-30

**Tabla 1.** Relación de casos estudiados.

### 3. 4. OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN

#### 3. 4.1. VARIABLES ESTUDIADAS

Las variables que estudiamos fueron las siguientes:

- **Embrión:** Fase del desarrollo embrionario que abarca desde el momento en el que el ovocito fecundado se encuentra en el útero de hasta que se produce el inicio de la organogénesis, y que finaliza a los 56 días a partir del momento de la fecundación<sup>76</sup>.
- **Feto:** Embrión con apariencia humana y con sus órganos formados, que va madurando desde los 57 días a partir del momento de la fecundación, hasta el momento del parto<sup>76</sup>.
- **Longitud del embrión/feto:** es la distancia, expresada en centímetros, del embrión o feto, desde el cráneo al talón.
- **Estadios del desarrollo prenatal:** El desarrollo embrionario primitivo se describe en estadios debido al tiempo variable que necesitan los embriones para desarrollar determinadas características morfológicas<sup>75</sup>.
- **Bloque:** Molde de parafina sólida que contiene el tejido a estudio una vez ha sido fijado, deshidratado e incluido en parafina.
- **Laminilla (portaobjetos):** Tiras de secciones del bloque de parafina extendidas sobre los portaobjetos tratados para la adhesión del material.

### **3.4.2. FUENTES DE LAS QUE SE OBTUVIERON LOS DATOS**

Los datos fueron obtenidos de la revisión de las historias clínicas de los abortos y de las hojas de petición de estudio anatomopatológico, de las muestras procedentes de los mismos abortos. Todos ellos proceden de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica de Hospital Universitario Central de Asturias.

### **3.4.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

#### **3.4.3.1. Preparación de las muestras para estudio histológico**

El procesamiento de los tejidos se realizó según la técnica habitual de preparación de muestras para su estudio histológico con microscopio óptico, utilizando el formol como fijador y soluciones alcohólicas en concentraciones crecientes para su deshidratación. Antes de su inclusión en parafina, las muestras fueron introducidas en un baño de xilol para su aclaramiento. Cuando los cortes se encontraban sobre los portas la parafina era eliminada en un solvente orgánico, nuevamente incluidos en Xilol y, posteriormente, para rehidratarlos, pasados por una serie de graduaciones decrecientes de alcohol etílico hasta llegar a una solución 100% de agua. Una vez rehidratadas, las muestras eran teñían con Hematoxilina- Eosina y, ocasionalmente, Tricrómico de Masson y Pass. Tras su tinción se deshidrataban de nuevo para asegurar la fijación permanente del cubreobjetos.

#### **Técnica de procesamiento**

1. Identificación de la muestra a su llegada al Servicio de Anatomía Patológica mediante la asignación de número de biopsia y un número de bloque en el supuesto de obtención de varios bloques de una misma muestra.



2. Inclusión de muestras en formol, nunca después de haber transcurrido más de cinco horas desde la extracción. Los fetos menores de 5 centímetros se incluyeron en su totalidad, mientras que en los mayores de ese tamaño se tomaron secciones transversales y longitudinales de la extremidad superior e inferior.

Como medio de fijación se utilizó formol al 10%, variando el tiempo de fijación en función del tamaño de la muestra: desde pocas horas hasta casi un día (para muestras grandes).

3. Inclusión de la muestra en parafina. La inclusión de la muestra en parafina se realizó de forma automática mediante un auto procesador modelo Jung T. P. 1050 (Leica Microsistemas, S.A.).

1- Formol al 10%	11- Parafina
2- Agua desmineralizada	12- Parafina
3- Alcohol 70%	13- Parafina
4- Alcohol 80%	14- Parafina
5- Alcohol 96%	15- Xilol de Limpieza
6- Alcohol absoluto	16- Xilol de limpieza
7- Alcohol absoluto	17- Alcohol absoluto de limpieza
8- Alcohol absoluto	
9- Xilol	
10- Xilol	

**Tabla 2.** Listado de reactivos según su orden de procesamiento.





4. Realización de los bloques: Los bloques se realizaron de forma manual según el procedimiento habitual, utilizando parafina líquida a 56°. A partir de los bloques de parafina se obtuvieron secciones de 4 µm mediante un microtomo tipo Leica RM 2145 (Leica Microsistemas, S.A.). Los cortes fueron estirados y pegados sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante 24 horas en una estufa a 42°.
5. Tinción de los cortes: La tinción con H x E se realizó de forma automática mediante un auto procesador modelo Jung Autostainer XL (Leica Microsistemas S.A.) utilizando los reactivos y tiempos especificados en la tabla 3. En las muestras con número de orden 4, 11, 23, 25, 32, 36 y 37 y número de biopsia 4771, 2576, 3498, 1941, 2859 y 2270 se utilizó además de la HxE, tricrómico de Masson como tinción para identificar el tejido fibroconectivo.

1- Estufa	13- Lavado agua
2- Xilol (4')	14- Eosina (2')
3- Xilol (3')	15- Lavado en agua
4- Xilol (1.5')	16- Alcohol 95° (15")
5- Xilol (1.5')	17- Alcohol 95° (15")
6- Alcohol absoluto (1')	18- Alcohol absoluto (2')
7- Alcohol absoluto (1')	19- Alcohol absoluto (2')
8- Alcohol 95° (2')	20- Alcohol absoluto (2')
9 Alcohol 70° (2')	21- Xylol (2')
10- Hematoxilina (2' 15")	22- Xylol (2')
11- Lavado en agua destilada	23- Xylol (2')
12- Virar en agua ácida (5")	

**Tabla 3.** Listado de reactivos y tiempos para la tinción de las muestras con HxE.



1- Estufa 30' a 60°	11- Acido fosfomolibdico 5'
2- Xilol 10-15'	12- Verde luz 5'
3- Alcohol absoluto 5'	13- Alcohol 70°
4- Alcohol 96 5'	14- Alcohol 96°
5- Alcohol 70% 5'	15- Xilol
6- Lavar H2O destilada	
7- Hematoxilina de Weigert 5'	
8- H2O corriente 10'	
9- Fucsina de Ponceau 5'	
10- Acido fosfomolibdico 5'	

**Tabla 4.** Listado de reactivos y tiempos para la tinción de las muestras con Tricrómico de MASSON.

6. Montaje de las laminillas. Para el montaje de las laminillas se utilizó un montador automático modelo CV 5000 (Leica Microsistemas S.A.) utilizando como medio de montaje la solución Neo Entellan® (Merck).

#### 3.4.3.2. Preparación de las muestras para estudio inmunohistoquímico

Para los estudios inmunohistoquímicos se seleccionaron 6 embriones y fetos que representaban, por su tamaño, diferentes estadios de desarrollo embrionario, y cuyos tejidos estaban mejor conservados al ser observados con la hematoxilina-eosina. De cada uno de los bloques de los diferentes embriones/fetos se efectuaron 10 cortes sobre portas.

Se depositaron secciones de tejido de 4  $\mu$ m sobre un baño de agua destilada precalentada a un máximo de 45° C. Posteriormente se montaron sobre laminillas FLEX IHC Microscope Slides (Dako) diseñadas para el montaje de secciones de tejidos fijados en formol y embebidas en parafina utilizadas en

inmunohistoquímica con el sistema de visualización EnVision™FLEX (Dako). A continuación se calentaron en una estufa durante 20-60 minutos a una temperatura entre 50-60°C. El desparafinado, hidratación y desenmascaramiento antigénico se llevó a cabo de forma automatizada en el PT Link (Dako) a 95° C con la solución recuperadora de antígeno durante un tiempo aproximado de 20 minutos. Posteriormente se pasaron las preparaciones a un recipiente conteniendo, en vez de agua destilada, Buffer de lavado.



**Figura 6.** PT Link (Dako).

A partir de este paso, la técnica de inmunotinción se llevó a cabo de forma automática en el inmuno-teñidor Autostainer plus (Dako) con el siguiente protocolo:



- |   |                                |
|---|--------------------------------|
| 1. Buffer lavado                          | 11. Synantofisina (20')        |
| 2. Solución bloqueante de Peroxidasa (5') | 12. Neurofilamentos (30')      |
| 3. Buffer lavado                          | 13. Ki-67: mibmib-1 (10')      |
| 4. Actina mc1A4 (10')                     | 14. Buffer lavado              |
| 5. Desmina: 33 (20')                      | 15. En Vision Peroxidasa (30') |
| 6. Miosina: MyoD1 (20')                   | 16. Buffer de lavado           |
| 7. CD-34 (10')                            | 17. Cromógeno DAB (10')        |
| 8. CD-31 JC/70 (20')                      | 18. Buffer de lavado           |
| 9. Vimentina:V9 (15')                     | 19. Hematoxilina (20')         |
| 10. S-100 (20')                           | 20. Agua destilada (5')        |
|   | 21. Buffer lavado (5')         |

**Tabla 5.** *Protocolo de técnica de inmunotinción automática.*

- Solución recuperadora de antígeno a PH alto (X10) (MD812)  
Referencia K8000/K8002/K8010/K8012/K8004/K8014 de Dako.
- Solución recuperadora de antígeno a PH Bajo ( PH 6) (x10) (MD809)  
Referencia S1699/K800/K8011/K8013/K8005/K88015 de Dako.
- Buffer de lavado (10X) (dM811)  
Referencia K8000/K8001/K8001/K8002/K8003/K8010/K8011/K8012/K8013 de Dako.
- Solución bloqueante de peroxidasa listo para usar (DM801)  
Referencia K8010/K8011/K8012/K8013 de Dako.
- En Vision Peroxidasa listo para usar (DM802)  
Referencia K8010/K8011/K8012/K8013 de Dako.
- Buffer sustrato (DM803). Referencia K8010/K8011/K8012/K8013 de Dako.
- DAB+cromógeno  
Referencia DK807/K8000/K8001/K8002/K8003/K8010/K8011/K8012/K8013 de Dako
- Hematoxilina lista para usar (DM806)  
Referencia K8018 de Dako.
- Diluyente del anticuerpo primario (DM810)  
Referencia S2022/K8006/K8016 de Dako.

**Tabla 6.** *Listado de reactivos necesarios así como su referencia y casa comercial.*

- Solución recuperadora de antígenos a PH alto (X10), diluir a 1/10 en agua bidestilada.
- Solución recuperadora de antígenos a PH bajo (X10), diluir a 1/10 en agua bidestilada.
- Buffer lavado (10X) (DM811), diluir a 1/10 en agua bidestilada.
- Anticuerpo primario, cada uno en la dilución indicada en el cuadro resumen.
- Cromógeno DAB de Dako (preparar cada día) con Buffer sustrato (DM803) 1ml y DAB+cromógeno 1 gota.

**Tabla 7.** *Preparación de reactivos.*



**Figura 7.** *Dako Autostainer.*

Posteriormente, de forma manual, se procedió a deshidratar, aclarar y cubrir los portas del modo reflejado en la tabla 8.

1. Solución alcohólica de 96° durante 3'
2. Alcohol absoluto durante 5'
3. Alcohol absoluto durante 5'
4. Xilol durante 5'
5. Xilol durante 5'
6. Cubrir con Neo Entellan® (Merck)

**Tabla 8.** Preparación de los portas.

#### **3.4.4. Anticuerpos utilizados**

##### **3.4.4.1. Filamentos intermedios**

###### ***Vimentina***

El anticuerpo anti-vimentina se utiliza en laboratorio para identificar cualitativamente por microscopía óptica las células de origen mesenquimal en tejidos normales y neoplásicos, utilizando métodos de pruebas inmunohistoquímicas. La vimentina es uno de varios filamentos intermedios con una masa molecular de 57 kD (p.ej., citoqueratinas, desmina, antígeno glial fibrilar, etc.) y se produce principalmente en células mesenquimales, tales como fibroblastos, condrocitos, células endoteliales y células del músculo liso vascular<sup>77</sup>. Puede ser el único filamento intermedio o coexistir con otro<sup>78</sup>. El anticuerpo marca las células de origen mesenquimal y sus tumores. Las células reactivas incluyen células linfoides normales y neoplásicas, células endoteliales, células de músculo liso y estriado, y células de Schwann<sup>78</sup>.

Pueden coexpresarse junto con otros filamentos intermedios, como la desmina en las células del músculo liso vascular, o la proteína ácida fibrilar glial en algunas células gliales. Azumi y cols demostraron la distribución de vimentina en la mayoría de células mesenquimales normales, tales como fibroblastos, células del músculo liso, lipocitos, células del nervio periférico (Schwann), células endoteliales vasculares y macrófagos<sup>79</sup>. También se ha demostrado que la vimentina se encuentra presente en muchos melanomas, meningiomas, schwannomas y sarcomas. Se ha descrito la positividad variable (10–57%) en algunos mesoteliomas, linfomas de células grandes y adenomas pleomórficos, adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas, carcinomas no diferenciados de células pequeñas, carcinoides, paragangliomas, timomas y neuroblastomas.

### ***Desmina***

El anticuerpo anti-desmina, D33, está indicado para su uso en laboratorio en la identificación cualitativa mediante microscopía óptica de células positivas a la desmina en tejidos neoplásicos y normales incluidos en parafina y fijados con formol utilizando métodos de análisis IHQ. Los resultados positivos ayudan en la clasificación de los tejidos neoplásicos del tipo de los leiomiomas, rhabdomyosarcomas y algunos leiomyosarcomas<sup>80-81</sup>.

Los resultados de un panel de anticuerpos ayudan en la identificación diferencial. La desmina pertenece a la clase III de filamentos intermedios, conformando parte del citoesqueleto, y es el filamento intermedio característico de los tres tipos de células musculares: esqueléticas, cardíacas y lisas. La desmina forma una red citoesquelética a lo largo de la fibra muscular que bordea con las membranas plasmática y nuclear. Concretamente, está ubicada en la región subplasmalémica y en la banda Z. El anticuerpo marca el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el músculo liso visceral y muchas células del músculo liso vascular<sup>82</sup>. En las células del músculo esquelético y cardíaco los filamentos de desmina se localizan en las bandas Z y en los discos intercalados, respectivamente<sup>80</sup>. También reacciona con las células de tumores

de origen miógeno, derivados del músculo liso (leiomiomas de útero y piel y algunos leiomiosarcomas gástricos) y derivados del músculo estriado<sup>80-81</sup>.

#### **3.4.4.2. Marcadores de diferenciación muscular.**

##### ***MyoD1***

El anticuerpo para la MyoD1 se usa en laboratorio para identificar cualitativamente por microscopía óptica las células positivas en MyoD1 en tejidos normales y neoplásicos, utilizando métodos de pruebas inmunohistoquímicas. El gen MyoD1 pertenece a una familia de genes de determinación miogénica, incluyendo miogenina, myf-5 y MRF4, todos los cuales codifican factores de transcripción<sup>83</sup>. Se mostró que la transfección de cADN de MyoD1 a células no musculares, activa la expresión de genes específicos de los músculos y, en algunos casos, induce la miogénesis<sup>84-85</sup>. La proteína MyoD1 es una fosfoproteína nuclear de 45 kD que induce la miogénesis a través de la activación transcripcional de genes específicos de los músculos<sup>86-87</sup>. (La expresión nuclear de MyoD1 está restringida al tejido de músculo esquelético, y se ha demostrado que es un marcador sensible de la diferenciación miogénica<sup>88</sup>. En los ensayos inmunohistoquímicos, el anticuerpo monoclonal de MyoD1 tiñe intensamente los núcleos de mioblastos en el tejido de músculo esquelético en desarrollo, mientras que se observó que la mayoría de los músculos esqueléticos adultos dan negativo<sup>84</sup>. Se demostró inmunotinción de MyoD1 en la mayoría de los rhabdomiosarcomas de diversos subtipos histológicos.<sup>87-88</sup> Los resultados de un estudio reciente por Wang y col. sugieren que la expresión de MyoD1 en los rhabdomiosarcomas guarda relación inversa con el grado de diferenciación celular de las células tumorales<sup>89</sup>. El patrón de tinción del anticuerpo de MyoD1 es nuclear.

##### ***Alfa Actina músculo liso (Actina ML)***

El anticuerpo anti-alfa-actina del músculo liso está indicado para su uso en laboratorio para identificar cualitativamente con el microscopio óptico las



células positivas anti-alfa-actina del músculo liso en tejidos normales y neoplásicos fijados con formol e incluidos en parafina mediante pruebas inmunohistoquímicas. Los resultados positivos contribuyen a la clasificación del tejido neoplásico (por ejemplo, leiomioma y leiomioma). En tejidos normales este anticuerpo reacciona con células de músculo liso, miofibroblastos, células mioepiteliales que rodean los acinos y conductos de las glándulas mamarias, células mioepiteliales de las glándulas salivales, una pequeña parte de las células estromales, vasos sanguíneos, capas externa longitudinal e interna circular y muscularis mucosae del intestino, capa media y algunos vasa vasorum de la aorta, y pericitos<sup>90-91</sup>. Este anticuerpo no reacciona con células de músculo liso parenquimales, fibroblastos (incluidos los fibroblastos adventiciales), músculo estriado, miocardio, células epiteliales (incluido el borde en cepillo del intestino) y células epiteliales y estromales de glándulas mamarias y salivales normales. En tejidos anormales marca células mioepiteliales y estromales de carcinoma de glándulas mamarias, células estromales de carcinoma de glándulas salivales, leiomioma, leiomioma, leiomiomatosis intravascular y células perisinusoidales de las áreas periportal y perivenular del hígado asociadas a la fibrogénesis<sup>92-93</sup>.

#### **3.4.4.3. Marcadores de diferenciación endotelial**

##### **CD-31**

Marca principalmente las células endoteliales y es una herramienta útil para la identificación de trastornos vasculares benignos y malignos, incluidos los angiosarcomas<sup>94-95</sup>. Además, es valioso para marcar los vasos sanguíneos a fin de determinar la angiogénesis en diversos tipos de tumores<sup>96-97</sup>. El CD31 se expresa en todos los endotelios continuos, incluidos los de las arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares no sinusoidales. En tejidos neoplásicos, diferencia las células endoteliales en diferentes lesiones vasculares benignas y malignas, como angiosarcomas, hemangioma epiteloides, hemangiopericitoma, angioendotelio, leiomioma, leiomioma y neuroblastoma<sup>98</sup>.

### **CD34**

El anticuerpo monoclonal murino anti-célula hematopoyética humana, CD34, está indicado para su uso en laboratorio en la identificación cualitativa mediante microscopía óptica de células progenitoras hematopoyéticas y células endoteliales en tejidos neoplásicos y normales incluidos en parafina y fijados con formol utilizando métodos de análisis inmunohistoquímicos. El anticuerpo anti-CD34 es valioso en la identificación de tumores vasculares y en la caracterización de la leucemia<sup>99</sup>. El anticuerpo reacciona además con las células intersticiales dendríticas presentes en muchos órganos, brotes vasculares en crecimiento de células endoteliales, con aproximadamente el 1% de las células mononucleares de la médula ósea y, en raras ocasiones, con el miometrio. El anticuerpo anti-CD34 marca las células endoteliales vasculares en la dermis papilar de la piel humana normal. También tiñe las células endoteliales de las arteriolas, capilares y vénulas poscapilares; del mismo modo que la región de la membrana basal de glándulas humanas, y las células progenitoras hematopoyéticas y linfoides humanas<sup>100</sup>.

La expresión de CD34 se limita solamente al 1–3% de leucocitos normales de la médula ósea y no se expresa altamente en células con un estadio de diferenciación más avanzado. De hecho, la expresión de CD34 se presenta solamente en células progenitoras hematopoyéticas inmaduras. No hay expresión de CD34 en las células hematopoyéticas más maduras de la sangre humana (células B, células T, células NK, monocitos, granulocitos, plaquetas, eritrocitos) ni en las células de la médula ósea<sup>101</sup>.

#### **3.4.3.3.4. Marcadores de diferenciación neural**

### **S100**

El anticuerpo contra la S100 reacciona con la proteína S100 humana. En los tejidos normales se asocia con células gliales del sistema nervioso central (SNC), células estrelladas de la adenohipófisis, melanocitos y condrocitos. En

los estudios inmunohistoquímicos, los resultados positivos incluyen a las células gliales, las neuronas, las células de Schwann, los melanocitos, las células de Langerhans y las células reticulares interdigitantes en los tejidos linfáticos. El anticuerpo contra la S100 detecta más del 99% de los nevus intradérmicos y de los melanomas, entre los que se incluyen los tipos nodulares y de diseminación superficial, amelanocíticos, desmoplásticos<sup>102-103</sup>. También tiñe algunos de los tumores no melanocíticos, que incluyen a los gliomas, (Dako Corporation. Report on file), algunos schwannomas (específicamente los que se asocian con la enfermedad de Von Recklinghausen o con los troncos nerviosos), tumores condrocíticos como el condroblastoma, el condrosarcoma, el encondroma<sup>104</sup> y los histiocitos de células de Langerhans<sup>105-106</sup>.

### ***Sinaptofisina***

El anticuerpo anti-Sinaptofisina marca las vesículas presinápticas de varios tipos de neuronas y, por lo tanto, es adecuado para observar la sinapsis<sup>107</sup>. Además, es una herramienta útil para la identificación de una amplia gama de neoplasias neuroendocrinas de tipo neural, entre las que se incluyen los neuroblastomas, los ganglioneuroblastomas, los ganglioneuomas, los feocromocitomas y los paragangliomas.

La sinaptofisina es una glicoproteína ácida y homo-oligomérica integrante de la membrana. La proteína es un componente de las vesículas sinápticas pequeñas (SSV) clásicas recicladas exocitóticas o endocitóticas del terminal nervioso, presentes en la mayoría de las neuronas y consideradas como orgánulos específicos de las neuronas sin equivalente en células no neuronales<sup>108</sup>. El microscopio electrónico muestra que el anticuerpo marca casi exclusivamente los terminales sinápticos del cerebro y la médula ósea y tiñe específicamente las superficies citoplasmáticas de las vesículas presinápticas. En el cerebro humano, la médula espinal y el músculo, el anticuerpo marca las estructuras neuronales, especialmente en las sinapsis<sup>109</sup>. En todas las células islote del páncreas<sup>110</sup> y en la glándula pituitaria, los cinco tipos de células adenohipofisarias dan positivo<sup>111</sup>. Salvo los tejidos nervioso, neuroendocrino y

la médula suprarrenal, todos los sometidos a pruebas (riñón, hígado, intestino delgado, esófago, músculo, timo, testículos y ovario) dan negativo<sup>109-112</sup>.

### **Neurofilamentos (NFP)**

Los NFP pertenecen a la familia de filamentos intermedios y son elementos estructurales del citoesqueleto neuronal donde se conectan con microfilamentos de Actina, microtúbulos y otros filamentos intermedios. Los NFP se componen de tres subunidades que son proteínas diferentes, pero relacionadas entre sí: NF-L (70 kDa), NF-M (150-160 kDa) y NF-H (200 kDa). Los determinantes antigénicos de cada una de las subunidades pueden ser únicos o compartidos y cada subunidad NF es un producto genético independiente. Durante la neurogénesis embrionaria, se coexpresan las subunidades NF-L y NF-M, mientras que la activación de la subunidad NF-H se pospone hasta el periodo postnatal. Las subunidades NF-M y NF-H no pueden autoagruparse y, normalmente, forman copolímeros con NF-L<sup>113-114</sup>.

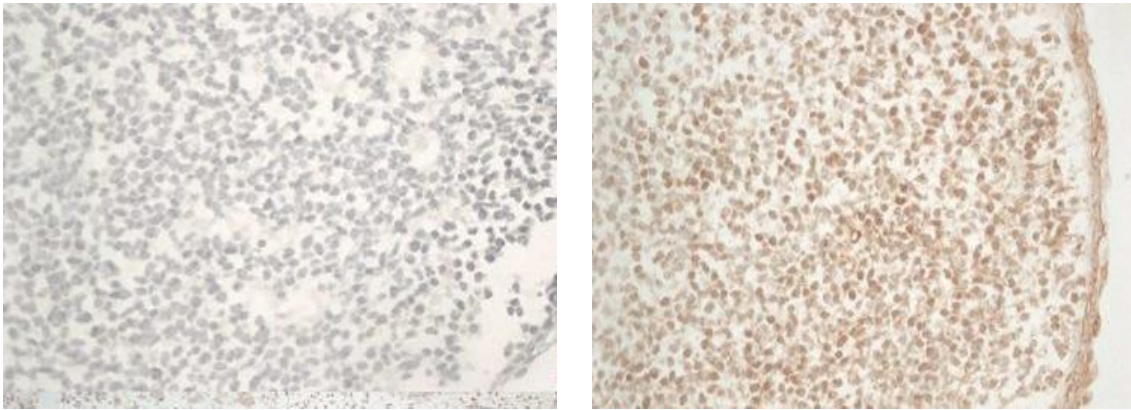
El anticuerpo marca neuronas (axones) del sistema nervioso central y periférico<sup>115-116</sup> y es una herramienta útil para la identificación de tumores con diferenciación neuronal<sup>115-117</sup>.

Anticuerpo	Dilución	Control	Casa Comercial	Clon
Vimentina:V9	1:400	Melanoma	Biogenex	MU 074.UC
Desmina:33	1:80	Leiomioma	Biogenex	Abn <sup>o</sup> .072M
MyoD1	1:50		Dako	5.8A
Actina ML:1A4	1:100	Intestino	Biogenex	MU-128.UC
CD-31 JC/70	1:50	Piel	Dako	M 0823
CD 34	1:50	T. Vascular	Novocastra	NLC-End
S-100	1:200	Nervio	Biogenex	PU 058 UP
Sinantofisina	1:100	Carcinoide	Dako	N1566
Neurofilamentos	1:50	Colon	Dako	2F11

**Tabla 9.** Relación de anticuerpos empleados en el estudio.

### 3. 5. VALORACION DE LOS RESULTADOS INMUNOHISTOQUIMICOS

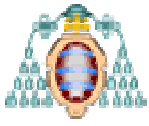
La positividad para los diferentes anticuerpos fue valorada como reacción positiva o negativa. Se consideró reacción positiva cuando las células adquirían un tono amarillo-marrón cuya intensidad variaba entre +, ++ y +++ y que se situaba en el citoplasma, en los núcleos o en ambos, dependiendo del anticuerpo utilizado. Si no existía presencia de tonalidad marrón se consideraba reacción negativa (-).



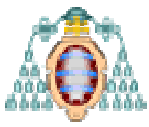
**Figura 8.** Ejemplos de reacción positiva y negativa, a izquierda y derecha, respectivamente.

### 3.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las limitaciones del estudio fueron que no descartan la subjetividad del investigador, la imposibilidad de realizar comparaciones, la posibilidad de la influencia del azar en los resultados y, en definitiva, la falta de evidencias sólidas para fundamentar y generalizar las conclusiones. A pesar de todo, la atemporalidad y el detallado estudio de la muestra, entendemos que suficiente para, al menos, generar la hipótesis de que los estudios histológicos e inmunohistoquímicos pueden servir para el estudio de otras patologías desde la embriogénesis, entendemos que compensan las limitaciones y lo justifican.



## **IV. RESULTADOS**



Los resultados los dividimos en dos apartados: los resultados con HxE y los resultados con IHQ. Dentro de cada uno, a su vez, establecemos cuatro periodos o etapas del desarrollo con características histológicas comunes. Un primer periodo que abarca a los fetos menores o iguales a 1,5cm, denominado *periodo de indiferenciación*; un segundo periodo para fetos de hasta 4 cm (*periodo de diferenciación temprana*); otro que abarca fetos de 5 a 10 cm al que se denomina *periodo de diferenciación intermedia*; y, por último, el *periodo de diferenciación tardía*, que corresponde a fetos con características próximas al tejido adulto.

En este apartado se muestran sólo las imágenes más representativas de los cambios morfológicos del desarrollo del mesénquima que nos han llevado a establecer las cuatro etapas que dividen el proceso, por otra parte continuo, de la maduración tisular.

En el apartado de la IHQ utilizamos cuatro grupo de marcadores tisulares: Filamentos intermedios (Vimentina y Desmina); Marcadores de diferenciación muscular (MyoD1 y Actina ML); Marcadores de diferenciación endotelial, como son el CD31 y el CD34; y, por último, los marcadores diferenciación neural (S100, NFP y Sinaptofisina). Cada marcador se utiliza en cada una de las cuatro etapas para observar cómo evoluciona la expresión de los mismos en las células dependiendo del grado de maduración mesenquimal.

Se consideraba una reacción positiva cuando las células adquirían un tono amarillo-marrón cuya intensidad variaba entre +, ++ y +++, situándose en el citoplasma, en los núcleos o en ambos, dependiendo del anticuerpo utilizado. Si no existía presencia de tonalidad marrón se consideraba reacción negativa (-).

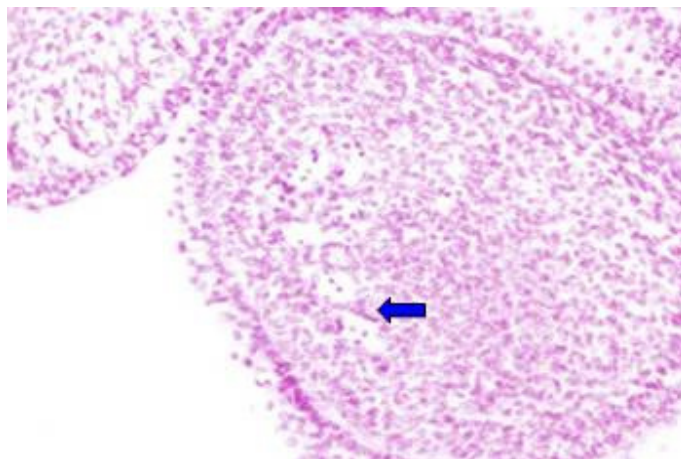
## 4. 1. RESULTADOS CON HEMATOXILINA-EOSINA

### 4.1.1. Periodo de indiferenciación

Las extremidades están formadas por yemas de tejido en las que la mayoría de las células presentan núcleos redondos con citoplasma casi inaparente. Existen escasas células fusiformes con núcleos centrales y se observa algún espacio tapizado por células planas (capilares) que posee hematíes nucleados intraluminalmente, aunque la mayoría de las células de la sangre están libres en el mesénquima. La epidermis está formada por una sola capa de células cuboidales (Fig. 9). El único elemento claramente diferenciable es la presencia de los centros precondrales, formados por células de núcleos redondos de tamaño superior al de las células mesenquimales indiferenciadas y separadas por abundante matriz clara (Fig. 10). Corresponde este periodo a fetos entre 0,5 y 1,5 cm.

#### 4.1.1.1.

<b>Muestra</b>	Nº 1 (B-97)
<b>Tamaño</b>	1 cm
<b>Edad aproximada</b>	5-6 semanas

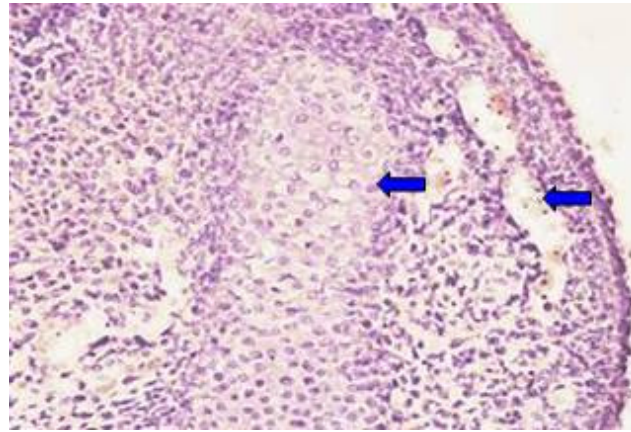


**Figura 9.** Células redondas indiferenciadas con espacios vasculares que contienen hematíes nucleados (HxE 10 x 20).



## 4.1.1.2.

<b>Fetos</b>	Nº 2, 3 (B-2606, 1740)
<b>Tamaño</b>	1.5 cm
<b>Edad aproximada</b>	6 semanas



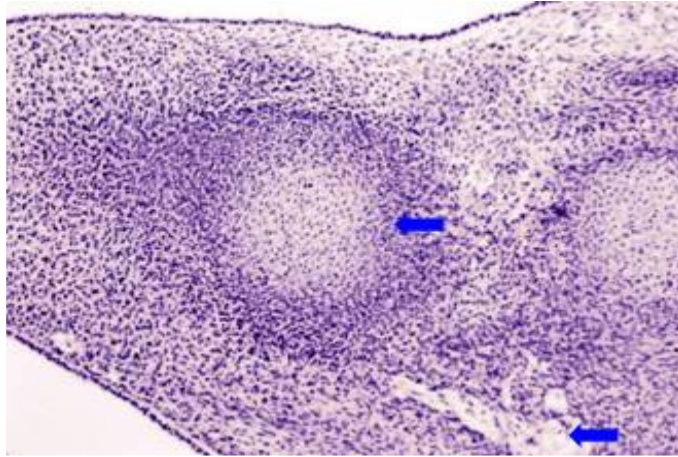
**Figura 10.** *Células redondas indiferenciadas. Capilares con hematíes nucleados y centros precondrales (HxE 10 x 20).*

**4.1.2. Periodo de diferenciación temprana**

En este período las extremidades están formadas por yemas de tejido donde la mayoría de las células son redondas, con citoplasma casi inaparente. Aumenta con respecto al periodo anterior el número de células fusiformes con núcleos centrales que pueden corresponder a miofibroblastos o fibroblastos. Dichas células adquieren cierto grado de polarización. Los centros precondrales están claramente diferenciados y ocupan un importante espacio dentro del mesénquima indiferenciado. Se observa la epidermis con una o varias capas y la presencia de finas fibras sin encapsular que pueden corresponder a fibras nerviosas (Fig. 11). También se observa la presencia de tejido laxo subepidérmico (Fig. 12). Se identifica tejido cartilaginoso separado por mesénquima indiferenciado (mesénquima articular) y comienzan a parecer los miotúbulos o espacios alargados claros con núcleos centrales (sarcolema). Existen abundantes capilares que contienen hematíes nucleados (Figs. 13 y 14). El tamaño corresponde a fetos de 1,5 a 4 cm.

4.1.2.1.

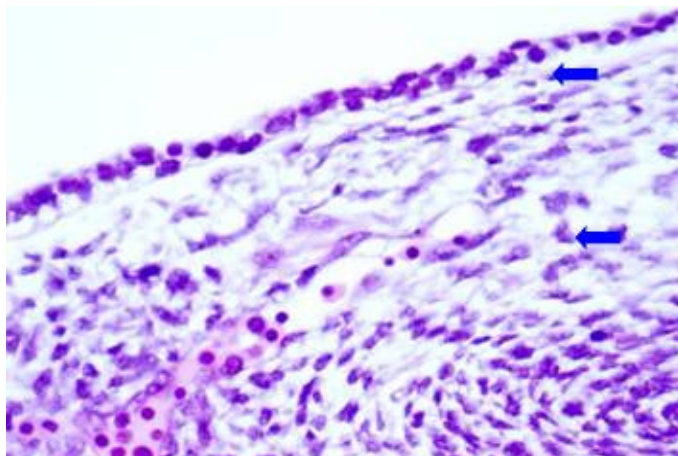
<b>Fetos</b>	nº 5, 6, 7, 8 (2654, 2056, 1893, 4771)
<b>Tamaño</b>	2-3 cm
<b>Edad aproximada</b>	8-9 semanas



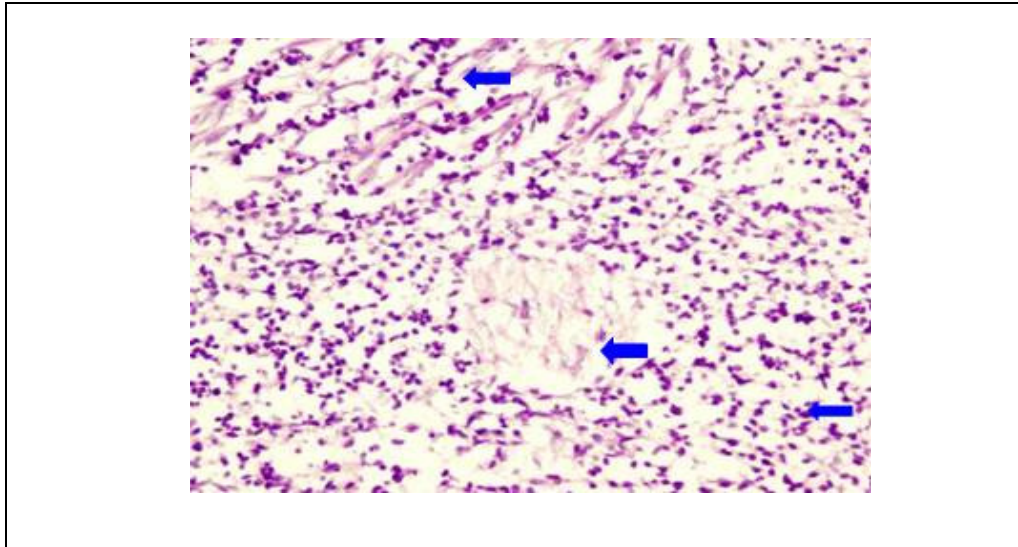
**Figura 11.** Centros precordiales, con clara presencia de fibras nerviosas (HxE 10 x 10).

4.1.2.2.

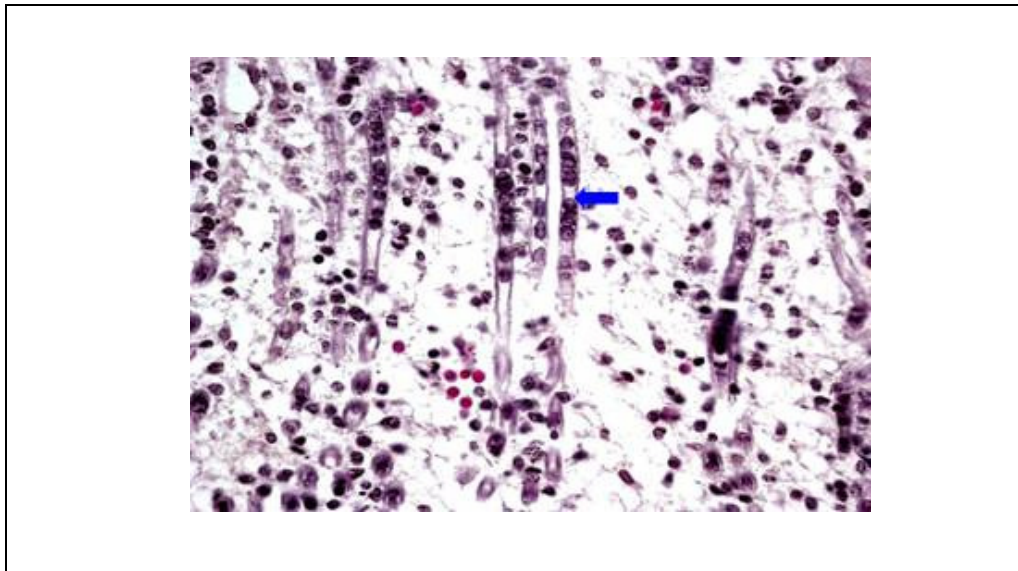
<b>Fetos</b>	Nº 9,10 (B-1239,2576)
<b>Tamaño</b>	3.5-4 cm
<b>Edad aproximada</b>	9 semanas



**Figura 12.** Epidermis con una sola capa de células y presencia de tejido laxo subepidérmico (HxE 10 x 40).



**Figura 13.** *Células redondas indiferenciadas, fibras neurales y primeros miotúbulos (HxE 10 x 20).*



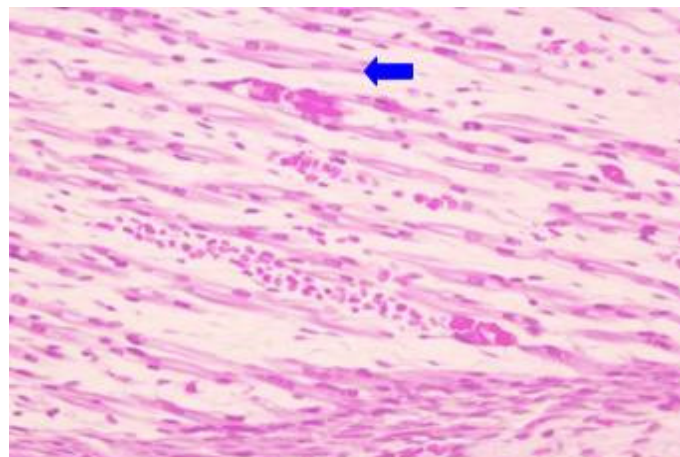
**Figura 14.** *Presencia de miotúbulos con núcleos centrales (HxE 10 x 20).*

### 4.1.3. Periodo de diferenciación intermedia.

En este periodo se observa un aumento de los miotúbulos con algunas miofibrillas con pequeños núcleos excéntricos (Fig. 15). A medida que avanza la edad de gestación, aparecen fibras agrupadas en fascículos, algunas con el sarcolema totalmente relleno de miofibrillas. Se produce la licuefacción del mesénquima intercartilaginoso, comenzándose a formar la cavidad articular (Fig. 16). Se observan también haces de fibras nerviosas bien desarrolladas y fibroblastos polarizados formando haces de tejido conectivo (Fig. 17). La epidermis estratificada y el tejido celular subcutáneo formado por tejido conectivo muy laxo con células estrelladas y escasos fibroblastos (Fig. 18). Sin embargo, no existen anejos cutáneos ni presencia de tejido adiposo bien constituido. Presencia de osificación endondral y tejido óseo inmaduro, muy celular y con finas espículas óseas (Figs. 19 y 20). Este periodo comprende a los fetos con tamaños de 6 a 10 cm.

#### 4.1.3.1.

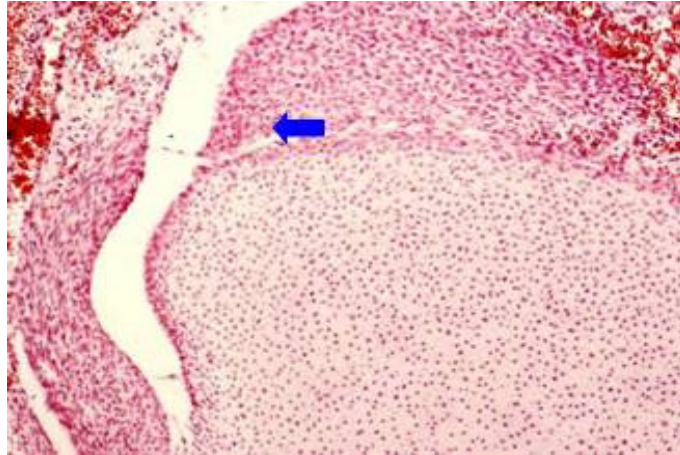
<b>Fetos</b>	nº 12,13,14 (B-3498, 2778, 1582)
<b>Tamaño</b>	5-6 cm
<b>Edad aproximada</b>	9-10 semanas



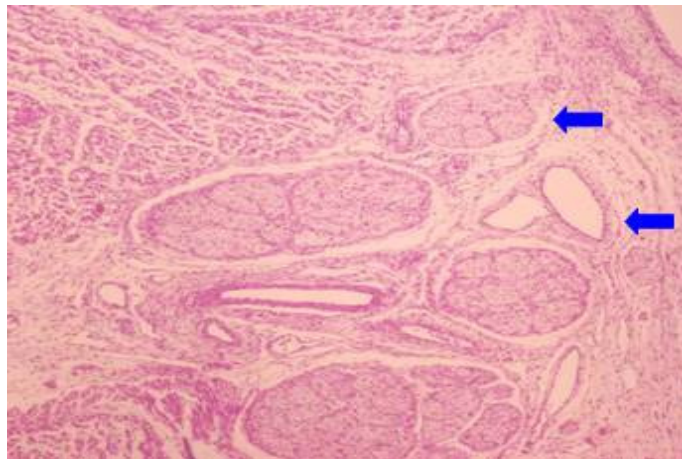
**Figura 15.** Presencia de miotúbulos con núcleos en la periferia. Comienzan a identificarse las miofibrillas. Se puede ver la presencia de tejido fibroconectivo (Hx E 10 x 20).

4.1.3.2.

<b>Fetos</b>	nº 15, 16, 18, 19 (2371, 2032, 22, 59)
<b>Tamaño</b>	6-9 cm
<b>Edad aproximada</b>	10-11 semanas



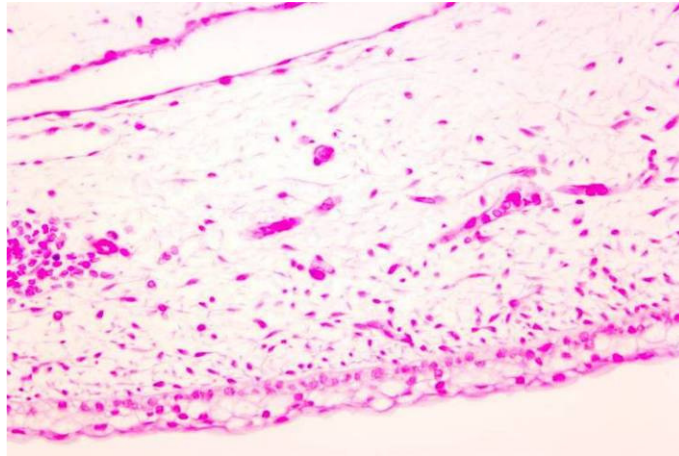
**Figura 16.** Cavity articular con cápsula sinovial (Hx E 10 x 20).



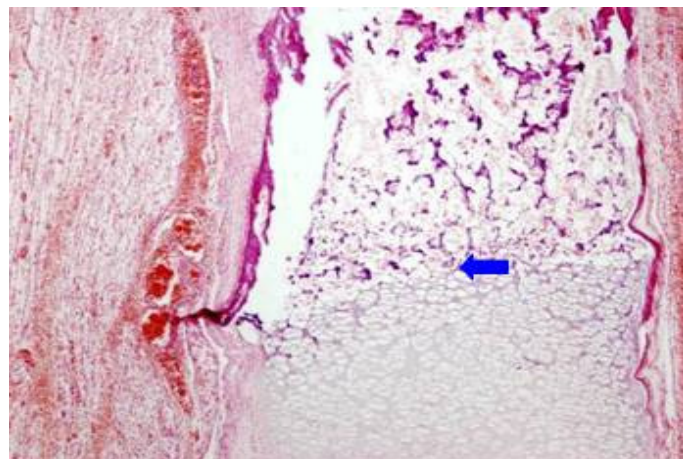
**Figura 17.** Presencia de haces nerviosos, músculo estriado y vasos (Hx E 10 x 10).

## 4.1.3.3.

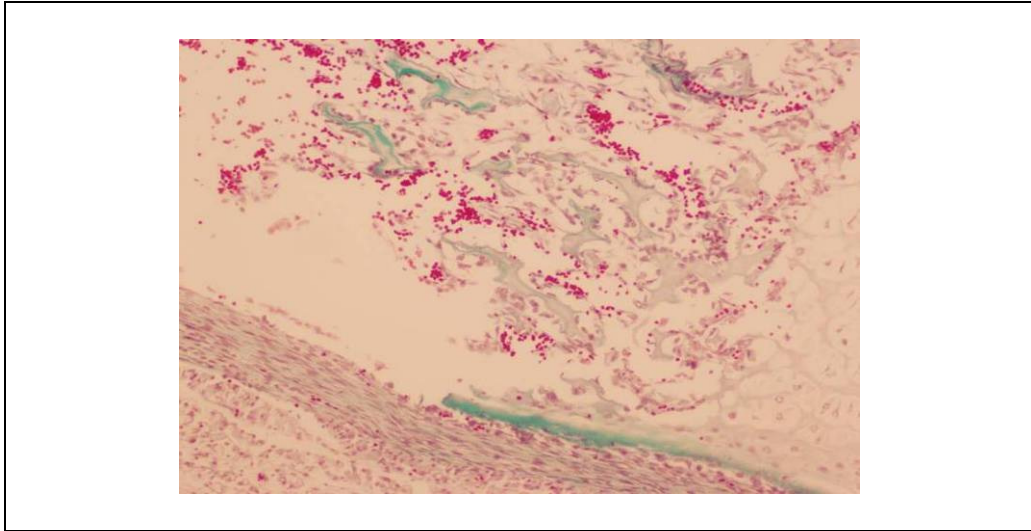
<b>Fetos</b>	nº 20, 21, 22 ( 2439 , 2101, 1390)
<b>Tamaño</b>	10 cm
<b>Edad aproximada</b>	11-12 semanas



**Figura 18.** *Tejido celular subcutáneo formado por tejido conectivo muy laxo, con células estrelladas y escasos fibroblastos. No existen anejos (HxE 10 x 20).*



**Figura 19.** *Presencia de osificación encondral (HxE 10 x 20).*



**Figura 20.** *Periostio y tejido óseo inmaduro (Tricrómico 10 x 10).*

#### 4.1.4. Periodo de diferenciación tardía

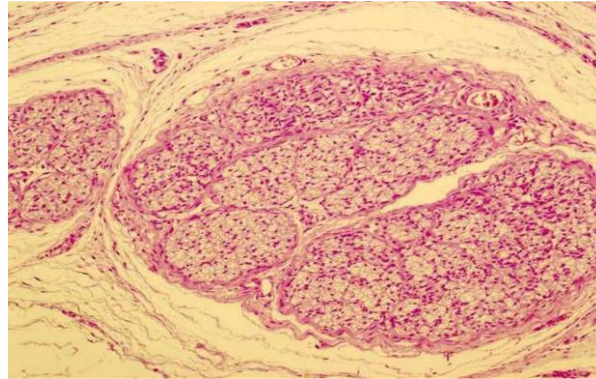
Las fibras nerviosas se agrupan en haces o fascículos separadas por tejido conjuntivo perineural y epineural (Fig. 21). El músculo está agrupado a su vez en fascículos diferenciados por el tejido conjuntivo que los delimita (Fig. 22). Aparecen vasos con capa muscular (Fig. 23). Proliferación capilar en el área subepidérmica alrededor de la cual aparecen adipoblastos ó células mesenquimales fusiformes o estrelladas organizadas en lóbulos (Fig. 24). Desarrollo del tejido adiposo con presencia de adipoblastos con vacuolas intracitoplasmáticas (Fig. 25). Los lóbulos, muy vascularizados, se unen unos con otros por debajo de un tejido laxo subepidérmico. Hay células con múltiples vacuolas pequeñas y otras con núcleo periférico que contiene una sola vacuola (Fig. 26). La piel presenta anejos cutáneos (Fig. 27).

En las diáfisis de los huesos existe una proliferación hacia el interior de los vasos, con formación de los centros de osificación (Fig. 28). El cartílago es muy celular y las espículas óseas son muy finas, mostrando en algunos casos calcificación. También se aprecia una médula ósea abundante (Fig. 29). Los osteoblastos se muestran unidos a las espículas óseas procedentes del periostio y del cartílago calcificado produciendo osteoide (Fig. 30). Por todo ello, en este momento podemos hablar de la existencia de hueso inmaduro. A partir de estos cambios el crecimiento es más en volumen que en modificaciones histológicas y ya tiene gran semejanza con los tejidos adultos. Hemos incluido en este periodo a los fetos de tamaño igual o superior a 11 cm.



4.1.4.1.

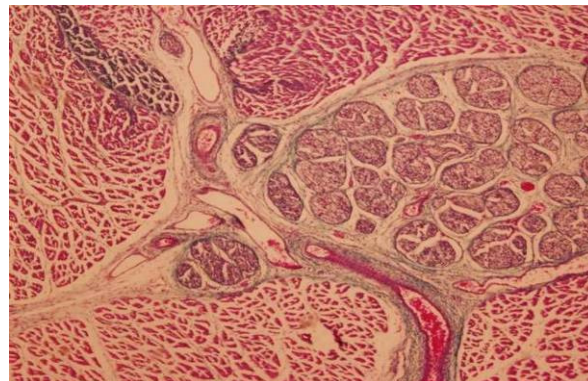
<b>Fetos</b>	Nº 24, 25, 26, 27, 28, 29(B-181, 2413, 1646, 1941, 2536, 2385)
<b>Tamaño</b>	11-13.5 cm
<b>Edad aproximada</b>	12-15 semanas



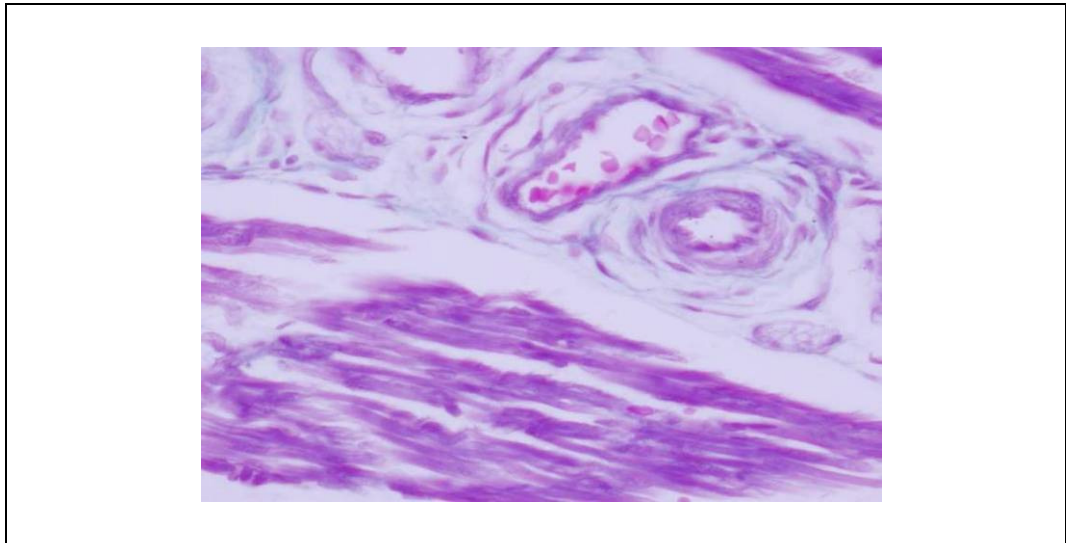
**Figura 21.** Grupos de fibras neurales agrupadas en haces y separadas por endoneuro (HxE 10 x 40).

4.1.4.2.

<b>Fetos</b>	Nº 30, 31 (B-2718, 2213)
<b>Tamaño</b>	14 cm
<b>Edad aproximada</b>	16 semanas



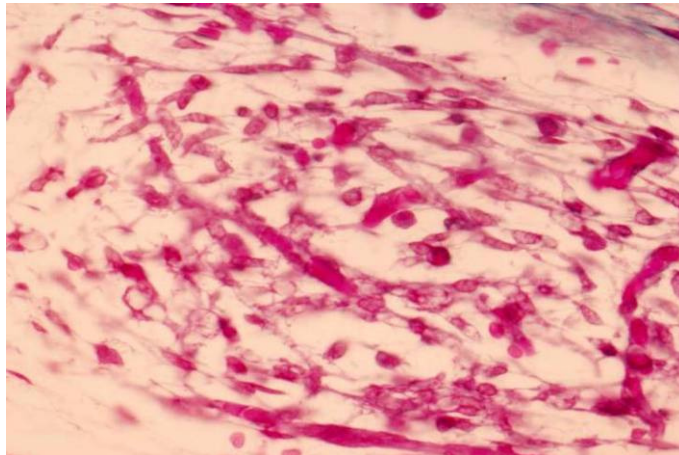
**Figura 22.** Fibras musculares en haces. Los nervios están agrupados en fibras separadas por tejido epineural y perineural (HxE 10 X 10).



**Figura 23.** Vasos con capa muscular (Tricrómico 10 x 40).

4.1.4.3.

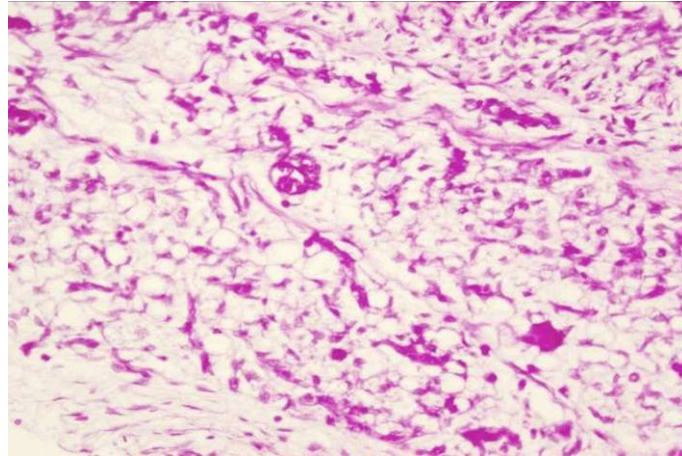
<b>Fetos</b>	Nº 32, 33, 35, 36 (B-740, 3039, 1917, 2695)
<b>Tamaño</b>	17-19 cm
<b>Edad aproximada</b>	17-20 semanas



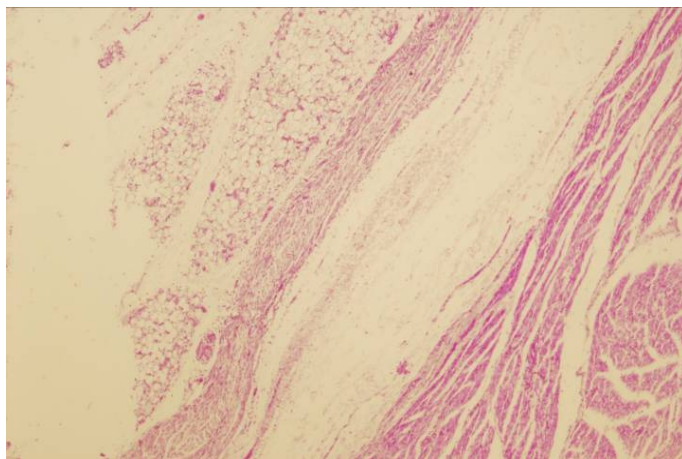
**Figura 24.** Proliferación capilar en el área subepidérmica alrededor de la cual aparecen adipoblastos ó células mesenquimales fusiformes o estrelladas (Hx E 10 x 20).

4.1.2.5.

<b>Fetos</b>	Nº 37, 38, 39 (B-1690, 1443, 2854)
<b>Tamaño</b>	19-20 cm.
<b>Edad aproximada</b>	20-21 semanas



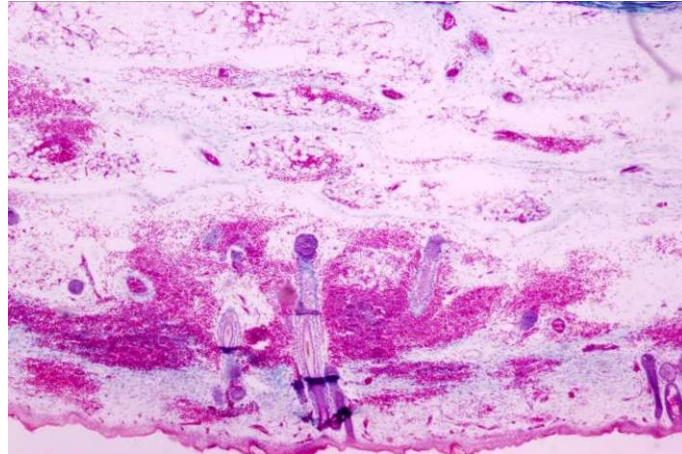
**Figura 25.** El tejido adiposo muestra presencia clara de adipoblastos con vacuolas intracitoplasmáticas (HxE 10 x 20).



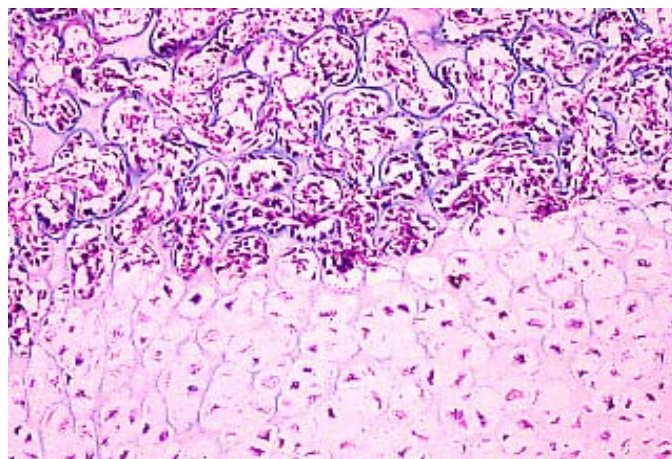
**Figura 26.** Los lóbulos del tejido adiposo se unen unos con otros por debajo de un tejido laxo subepidérmico (HxE x 100).

4.1.2.6.

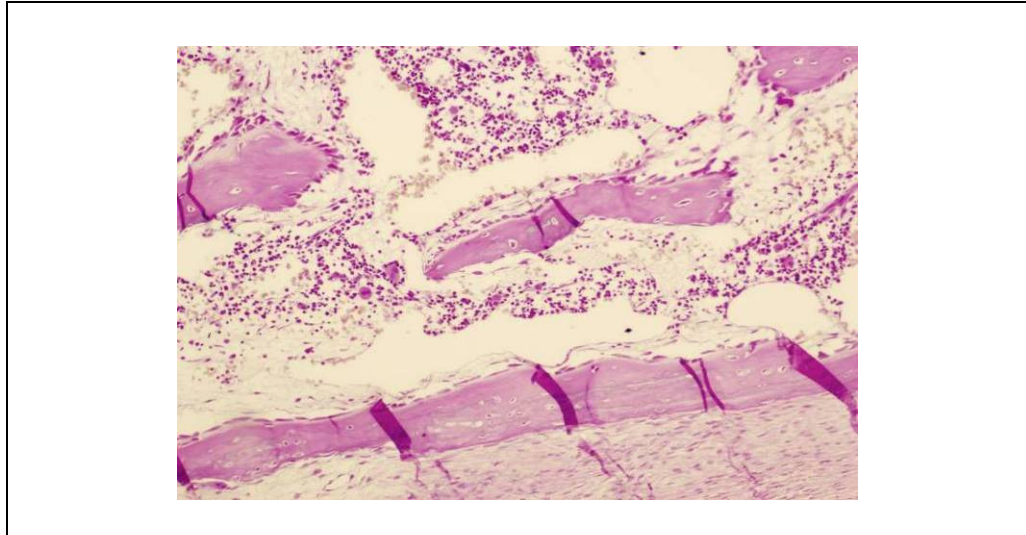
Fetos	Nº 40, 41 (B-2270, 1943)
Tamaño	28 cm
Edad aproximada	29-30 semanas



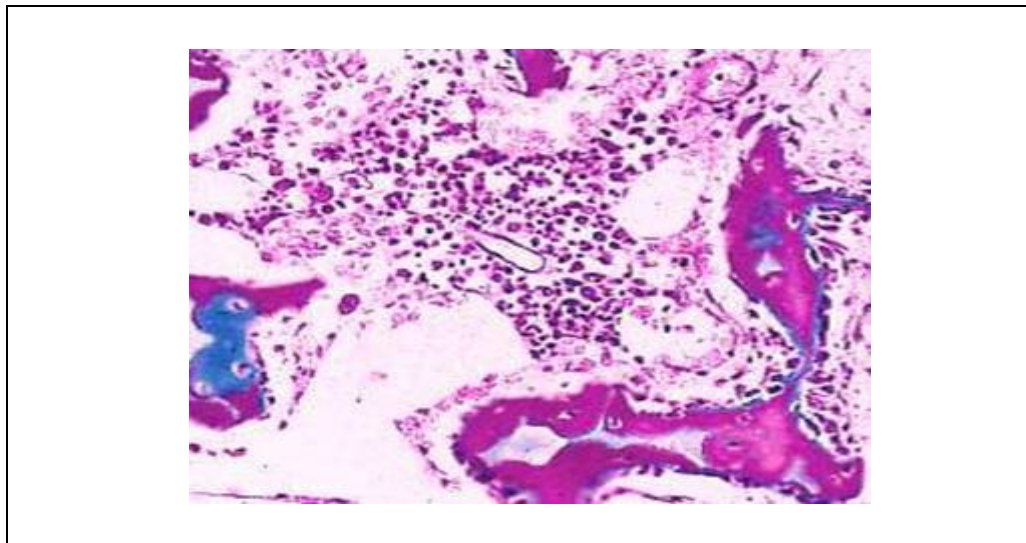
**Figura 27.** *Piel, subcutáneo y tejido adiposo (Hx E 10 x 10).*



**Figura 28.** *Área de transición cartílago-hueso (Tricrómico 10 x 10).*



**Figura 29.** *Espículas óseas muy finas. Algunas de ellas muestran calcificación. Abundante médula ósea (HxE 10 x 20).*



**Figura 30.** *El cartílago es muy celular y las espículas óseas son muy finas. Algunas de ellas muestran calcificación. Abundante médula ósea (Tricrómico 10 x 20).*

## 4. 2. RESULTADOS CON IMUNOHISTOQUIMICA

### 4.2.1. Periodo de indiferenciación

Dependiendo del anticuerpo utilizado como marcador celular en la IHQ, el resultado en el patrón de tinción varía. La Vimentina resulta positiva en la práctica totalidad del mesénquima y de forma muy marcada (Fig. 31). La Desmina y MyoD1, ambos marcadores del músculo esquelético, se expresan por un acumulo celular dispuesto cerca de los centros precondrales, con un patrón de tinción bastante parecido, si bien la Desmina se expresa de forma más intensa en el citoplasma celular y la MyoD1 de forma más tenue y nuclearmente (Figs. 32 y 33).

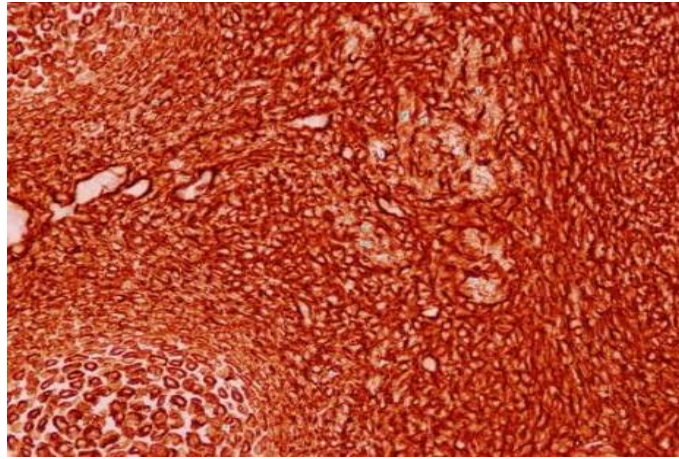
La positividad de la Actina ML resulta escasa y limitada al contorno de algún vaso y célula aislada (Fig. 34). El CD31, marcador endotelial, diferencia mejor que la anterior el contorno vascular, diferenciando los pequeños vasos dentro del mesénquima en regiones en donde la Actina ML no se expresa. También resulta positiva en alguna célula aislada dentro del mesénquima indiferenciado (Fig. 35). El patrón de tinción utilizando el CD34 resulta bastante parecido al dispuesto por el CD31, con representación del contorno vascular casi exclusivamente (Fig. 36). El S100 se expresa de forma débil en los núcleos de los condroblastos, además de marcar estructuras tubulares alargadas precursoras de nervios (Fig. 37).

Finalmente, comparando las figuras 31 y 32 se aprecia la similitud en el patrón de tinción del anticuerpo frente a la Sinaptofisina con el del anticuerpo frente a los Neurofilamentos, si bien en el primero la tinción resulta más débil que en el segundo. Ambos nos distinguen estructuras tubulares presuntamente precursoras de los nervios (Figs. 38 y 39).

4.2.1.1.

Vimentina

<b>Muestra</b>	Nº 4 (B915 4)
<b>Tamaño</b>	1,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	6-7 semanas

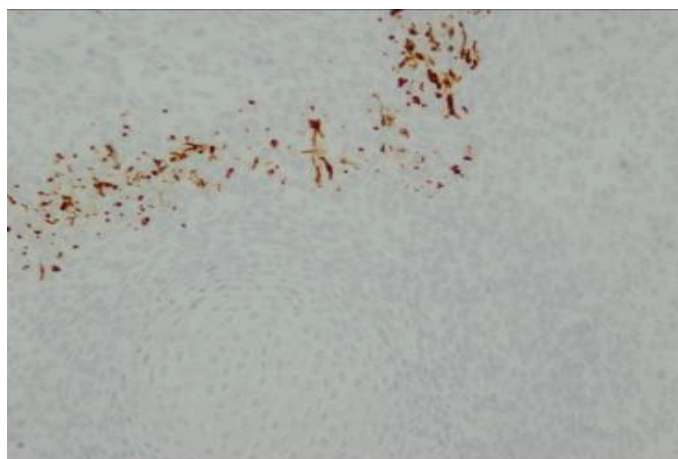


**Figura 31.** Positividad difusa del mesénquima (Vimentina 10 X 20).

4.2.1.2.

Desmina

<b>Muestra</b>	Nº 4 (B915 4)
<b>Tamaño</b>	1,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	6-7 semanas

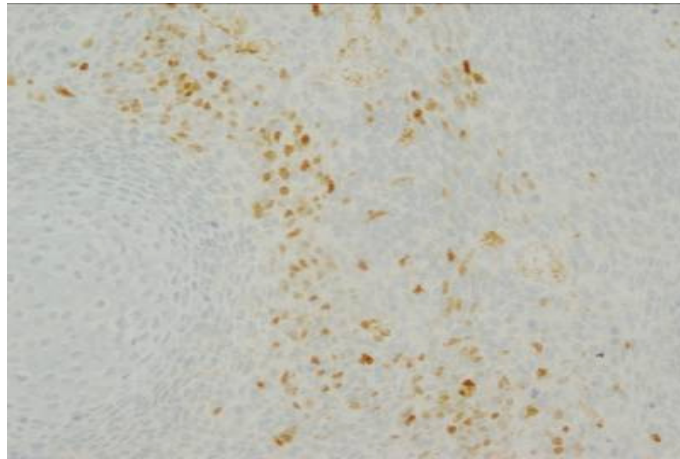


**Figura 32.** Positividad en algunas células aisladas redondas y fusocelulares (Desmina 10 X 20).

4.2.1.3.

MyoD1

<b>Muestra</b>	Nº 4 (B915 4)
<b>Tamaño</b>	1,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	6-7 semanas

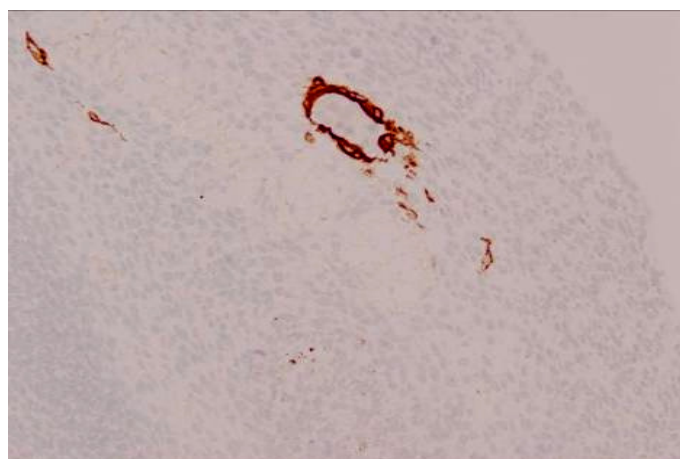


**Figura 33.** Positividad nuclear en algunas células indiferenciadas (MyoD1 10 X 20).

4.2.1.4.

Actina ML

<b>Muestra</b>	Nº 4 (B915 4)
<b>Tamaño</b>	1,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	6-7 semanas



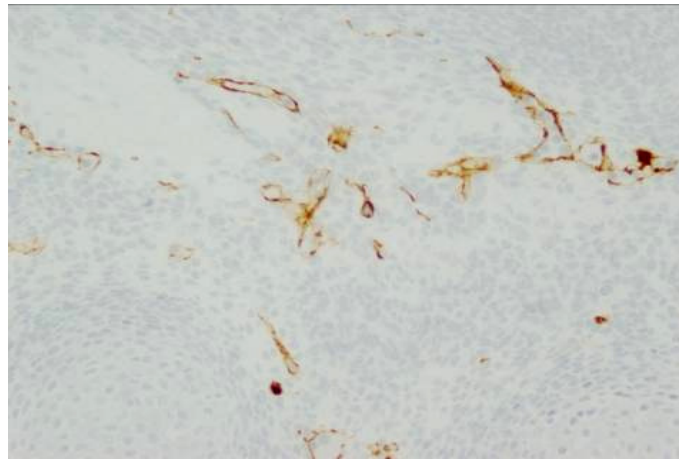
**Figura 34.** Positividad en el contorno vascular y alguna célula aislada (Actina ML 10 X 20).



4.2.1.5.

CD31

<b>Muestra</b>	Nº 4 (B915 4)
<b>Tamaño</b>	1,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	6-7 semanas

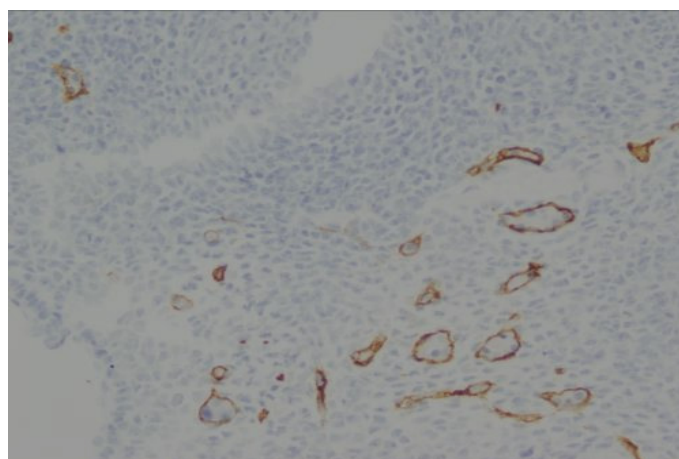


**Figura 35.** Positividad contorno vascular y alguna célula suelta (CD31 10 x 20).

4.2.1.6.

CD34

<b>Muestra</b>	Nº 4 (B915 4)
<b>Tamaño</b>	1,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	6-7 semanas

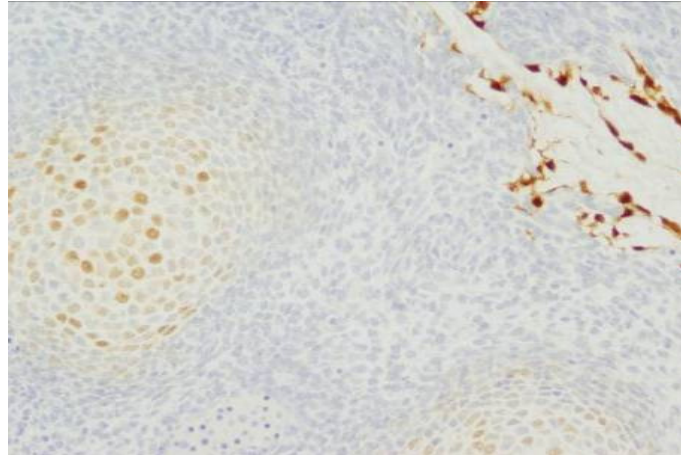


**Figura 36.** Positividad contorno vascular y alguna célula suelta (CD34 10 X 20).

4.2.1.7.

S100

<b>Muestra</b>	Nº 4 (B915 4)
<b>Tamaño</b>	1,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	6-7 semanas

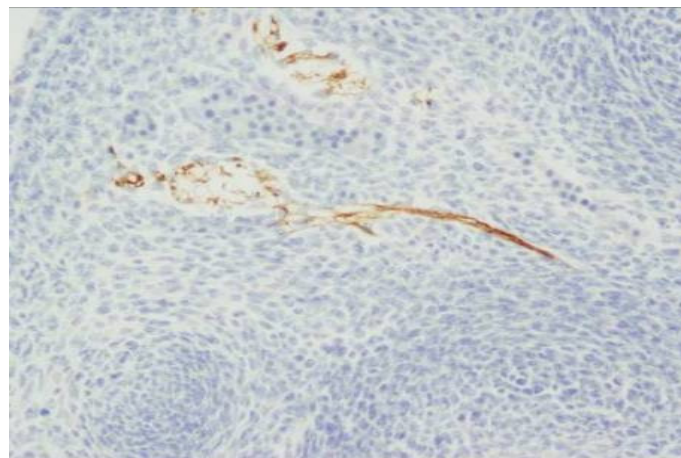


**Figura 37.** Positividad nuclear en centros precondrales y en estructuras tubulares de posible origen neural (S100 10 X 20).

4.2.1.8.

Sinapto  
fisina

<b>Muestra</b>	Nº 4 (B915 4)
<b>Tamaño</b>	1,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	6-7 semanas

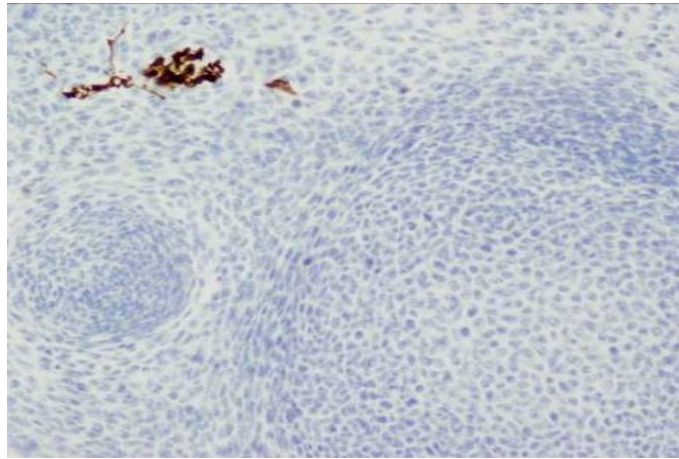


**Figura 38.** Positividad en forma de haces (Sinaptofisina 10 x 20).

4.2.1.9.

NFP

<b>Muestra</b>	Nº 4 (B915 4)
<b>Tamaño</b>	1,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	6-7 semanas



**Figura 39.** Positividad en forma de pequeños haces (NFP 10 X 20).

	Muscular	Cartilaginoso	Vascular	Conectivo	Nervioso	Adiposo
Vimentina	+++	+++	+++	+++	+++	-
Desmina	+++	-	-	-	-	-
MYOD1	++	-	-	-	-	-
Actina ML	-	-	++	-	-	-
CD31	-	-	++	-	-	-
CD34	-	-	++	-	-	-
S100	-	+	-	-	+++	-
Sinaptofisina	-	-	-	-	++	-
Neurofilamento	-	-	-	-	+++	-

**Tabla 3.** Resumen de los resultados de la IHQ en el periodo indiferenciado.

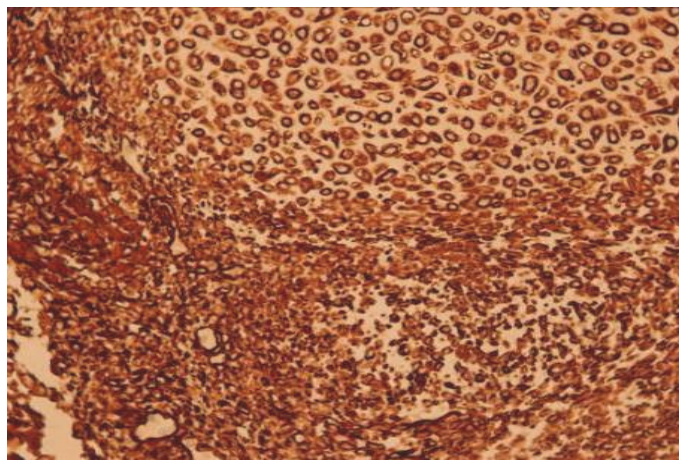
#### 4.2.2. Periodo de diferenciación temprana

En este periodo, la Vimentina continúa marcando la totalidad del mesénquima de forma bastante intensa (Fig. 40). La Desmina rellena el miotúbulo en la periferia (Fig. 41). La MyoD1 presenta positividad en núcleos aislados entre células redondas poco diferenciadas, en esta etapa ya se aprecian miotúbulos multinucleados con expresión débil en periferia del citoplasma y negatividad nuclear. (Fig. 42). También nos encontramos con expresión débil granular de estructuras alargadas compatibles con haces nerviosos. La Actina ML marca intensamente el contorno de los vasos de mayor tamaño y la periferia de los miotúbulos (Fig. 43). La CD31 se expresa en el contorno de pequeños vasos de forma intensa y bastante específica y el CD34 identifica, además de algún vaso pequeño, el tejido conjuntivo (periostio) que rodea al cartílago (Fig. 44 y 45). El S100 continúa expresándose en el cartílago y haces nerviosos (Fig. 46) y la Sinaptofisina mantiene su expresión exclusivamente en la fibra nerviosa periférica (Fig. 47). En la figura 48 se observa la positividad granular del haz nervioso para el anticuerpo frente a NFP con negatividad para el resto de estructuras.

##### 4.2.2.1.

##### Vimentina

<b>Muestra</b>	Nº 11 (B1648 4)
<b>Tamaño</b>	4 cm
<b>Edad aproximada</b>	9 semanas

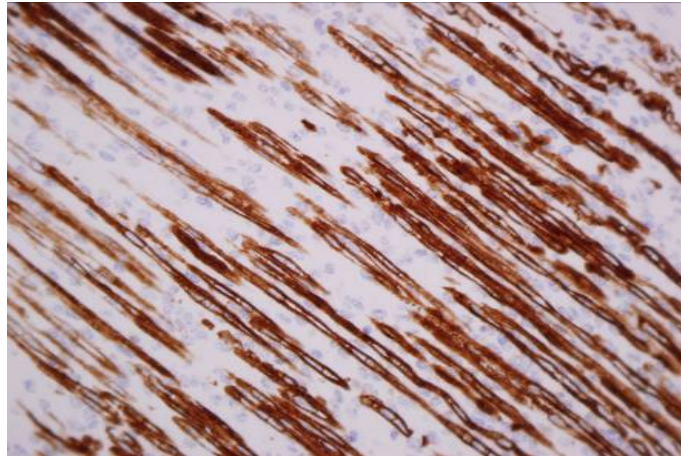


**Figura 40.** Positividad difusa (Vimentina 10 x 20).

4.2.2.2.

Desmina

<b>Muestra</b>	Nº 11 (B1648 4)
<b>Tamaño</b>	4 cm
<b>Edad aproximada</b>	9 semanas

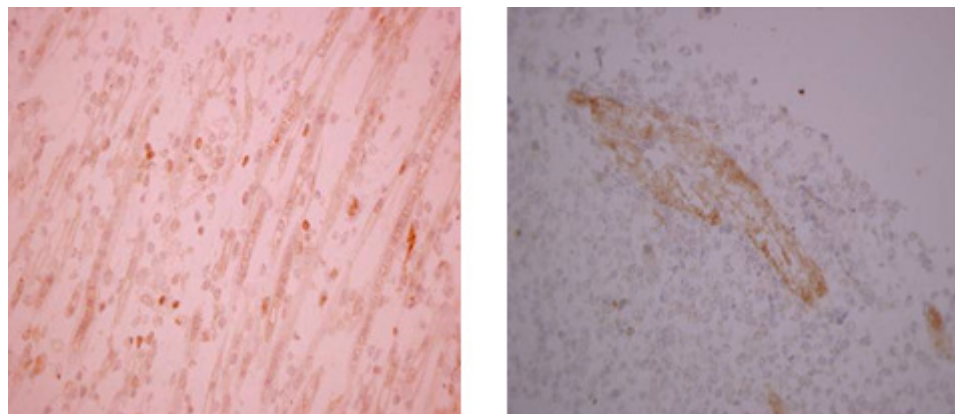


**Figura 41.** Miotúbulos positivos en periferia (Desmina 10 X 40).

IV.2.2.3.

MyoD1

<b>Muestra</b>	Nº 11 (B1648 4)
<b>Tamaño</b>	4 cm
<b>Edad aproximada</b>	9 semanas

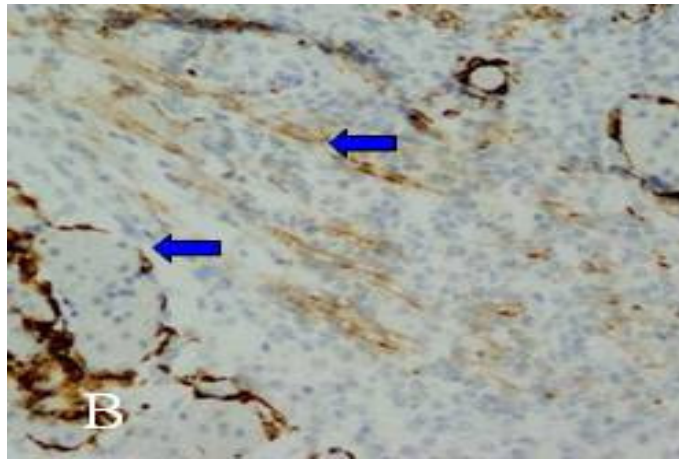


**Figura 42.** Positividad granular fibra nerviosa y núcleos sueltos miotúbulos (MyoD1 10 x 20).

4.2.2.4.

Actina ML

Muestra	Nº 11 (B1648 4)
Tamaño	4 cm
Edad aproximada	9 semanas

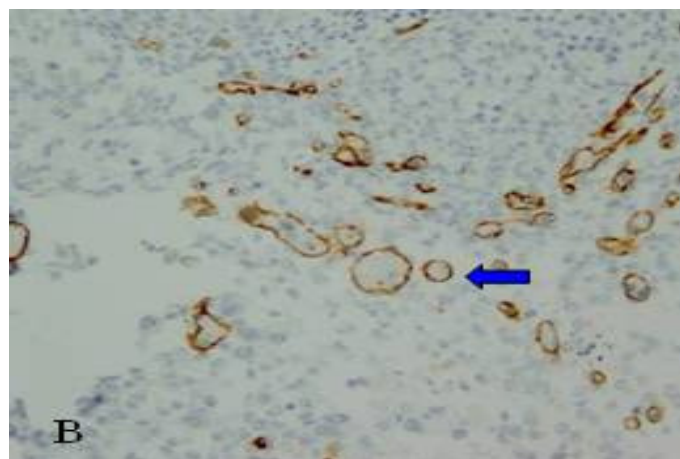


**Figura 43.** Positividad pared vascular y algún miotúbulo primario (Actina ML 10 X 20).

4.2.2.5.

CD31

Muestra	Nº 11 (B1648 4)
Tamaño	4 cm
Edad aproximada	9 semanas

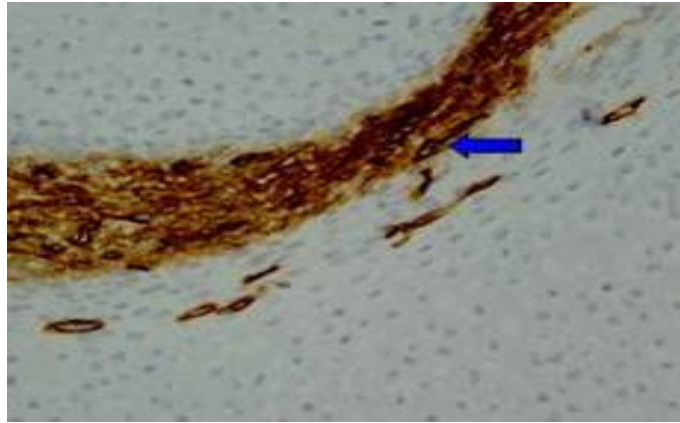


**Figura 44.** Positividad pared vasos (CD31 10 X 20).

4.2.2.6.

CD34

<b>Muestra</b>	Nº 11 (B1648 4)
<b>Tamaño</b>	4 cm
<b>Edad aproximada</b>	9 semanas

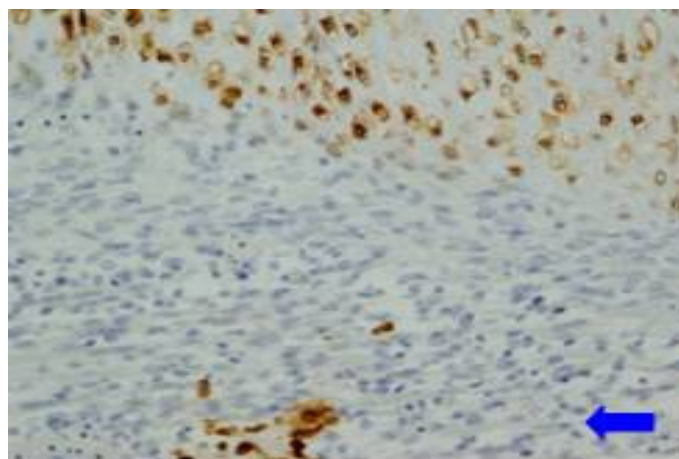


**Figura 45.** Positividad pared vascular y periostio (CD 34 10 X 20).

4.2.2.7.

S100

<b>Muestra</b>	Nº 11 (B1648 4)
<b>Tamaño</b>	4 cm
<b>Edad aproximada</b>	9 semanas

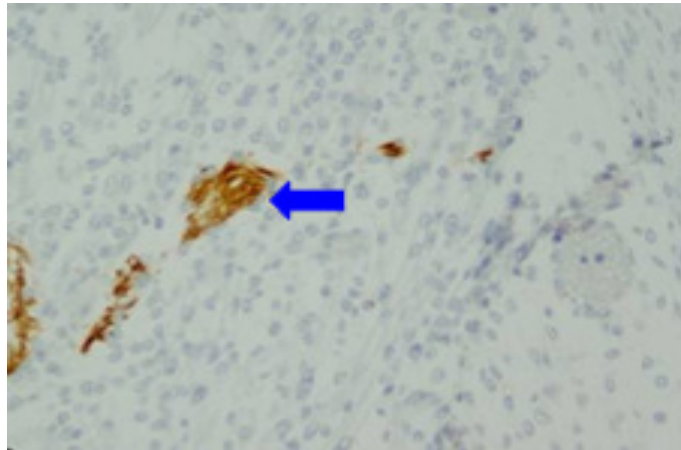


**Figura 46.** Positividad para el cartílago y periferia de fibras neurales (S100 10 X 20).

4.2.2.8.

Sinaptofisina

<b>Muestra</b>	Nº 11 (B1648 4)
<b>Tamaño</b>	4 cm
<b>Edad aproximada</b>	9 semanas

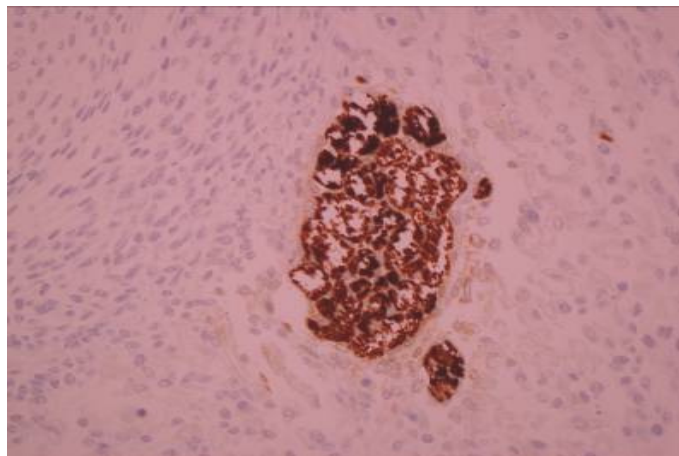


**Figura 47.** Positividad haces neurales (Sinaptofisina 10 X 20).

4.2.2.9.

NFP

<b>Muestra</b>	Nº 11 (B1648 4)
<b>Tamaño</b>	4 cm
<b>Edad aproximada</b>	9 semanas



**Figura 48.** Positividad granular nervio periférico (NFP 10 X 20).





	Muscular	Cartilaginoso	Vascular	Conectivo	Nervioso	Adiposo
Vimentina	+++	++	+++	+++	+++	-
Desmina	-	-	-	-	-	-
MYOD1	+	-	-	-	++	-
Actina ML	++	-	++	-	-	
CD31	-	-	++	-	-	-
CD34	-	-	++	+++	-	-
S100	-	++	-	-	+++	-
Sinaptofisina	-	-	-	-	++	-
Neurofilamento	-	-	-	-	+++	-

**Tabla 4.** Resumen de los resultados de la IHQ en el periodo de diferenciación temprana.

### 4.2.3. Periodo de diferenciación intermedia

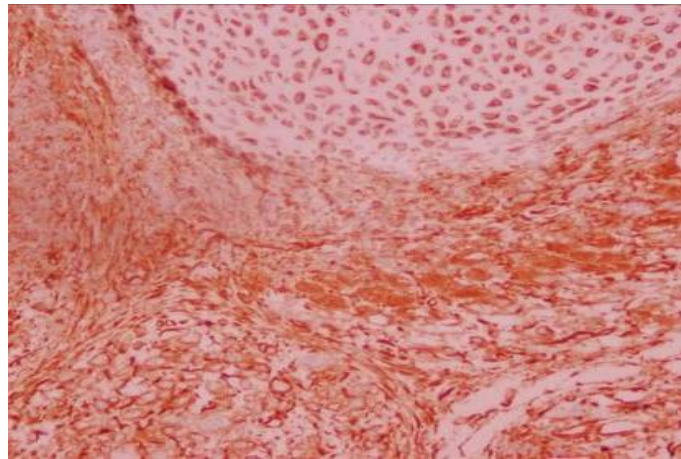
En este periodo tenemos para cada marcador las imágenes de dos figuras pertenecientes a fetos de edades diferentes. El primero tiene un tamaño de 7,5 cm. y 9 semanas de edad aproximadamente. El segundo tiene un tamaño de 10 cm. y se encuentra entre la 9<sup>o</sup> y 10<sup>a</sup> semana de gestación.

La expresión de la Vimentina por el mesénquima se debilita a medida que progresa la maduración tisular (Fig. 49). En la mayoría de los tejidos derivados del mesénquima la Vimentina se coexpresa con otros marcadores como la desmina del músculo esquelético y la Actina ML de la pared vascular. El cartílago es Vimentina negativo como muestran la figura 50. La expresión de la Desmina aumenta en el músculo estriado (Fig. 51) y la fibra se rellena de este filamento (Fig. 52). La MyoD1 mantiene positividad nuclear en los mioblastos mononucleados pero la pierde en miotúbulos multinucleados los cuales se tiñen con este anticuerpo en la periferia de su citoplasma (Figs. 53 y 54). También en la figura 53 marca la fibra nerviosa. La Actina ML continúa expresándose en el contorno vascular (Fig. 55). En la figura 48 también se expresa en el contorno de algún miotúbulo. El CD31 marca el endotelio vascular exclusivamente y el CD34 resulta positivo de forma bastante intensa para el tejido conjuntivo intercompartimental, aparte de los vasos (Figs. 57, 58, 59 y 60). El S100 mantiene en este periodo su afinidad por los nervios y al principio también se expresa en los condrocitos para luego negativizarse. Aparte, tiñe de forma tenue la periferia de algún miotúbulo y alguna célula suelta (Figs. 61 y 62). La Sinaptofisina y los NFP se expresan por estructuras nerviosas de forma bastante específica (Figs. 63, 64, 65 y 66).

4.2.3.3.

Vimentina

<b>Muestra</b>	Nº 17 (B15.842)
<b>Tamaño</b>	7,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	10-11 semanas

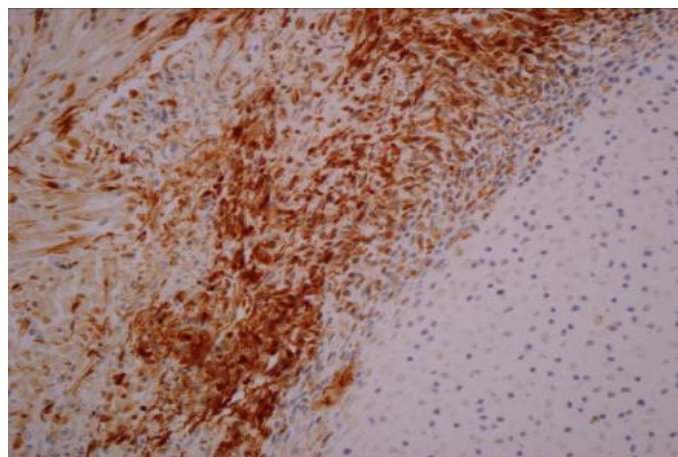


**Figura 49.** Positividad difusa tejido conectivo, más tenue en esbozo cartilaginoso (Vimentina 10 X 20).

4.2.3.4.

Vimentina

<b>Muestra</b>	Nº 23(B87 2)
<b>Tamaño</b>	10 cm
<b>Edad aproximada</b>	11-12 semanas

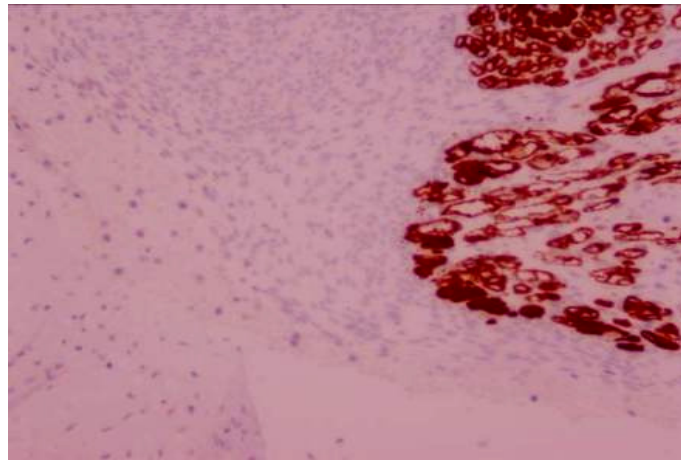


**Figura 50.** Positividad tejido conjuntivo, vascular y muscular. Cartílago negativo (Vimentina 10 X 20).

## 4.2.3.5.

Desmina

<b>Muestra</b>	Nº 17 (B15.842)
<b>Tamaño</b>	7.5 cm
<b>Edad aproximada</b>	10-11 semanas

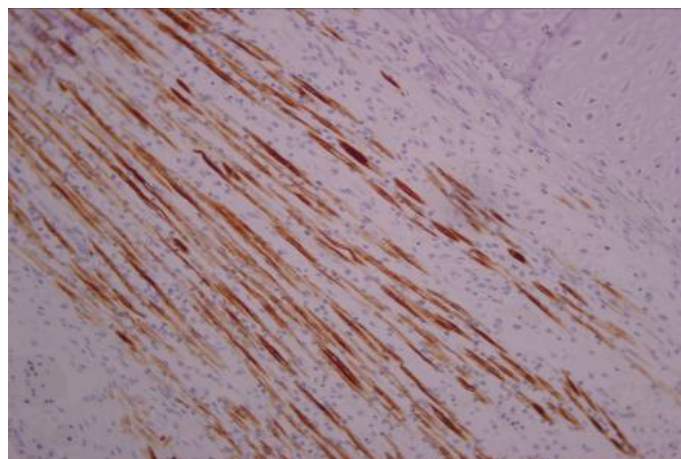


**Figura 51.** Positividad músculo estriado. Fibras totalmente rellanas y núcleos en la periferia (Desmina 10 X 40).

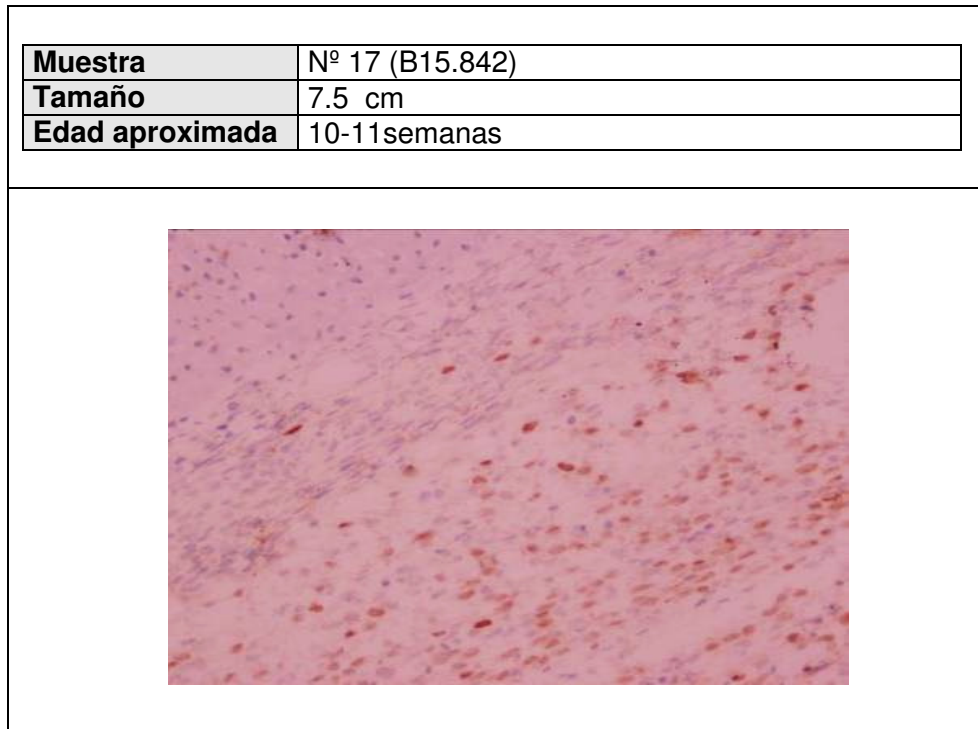
## 4.2.3.6.

Desmina

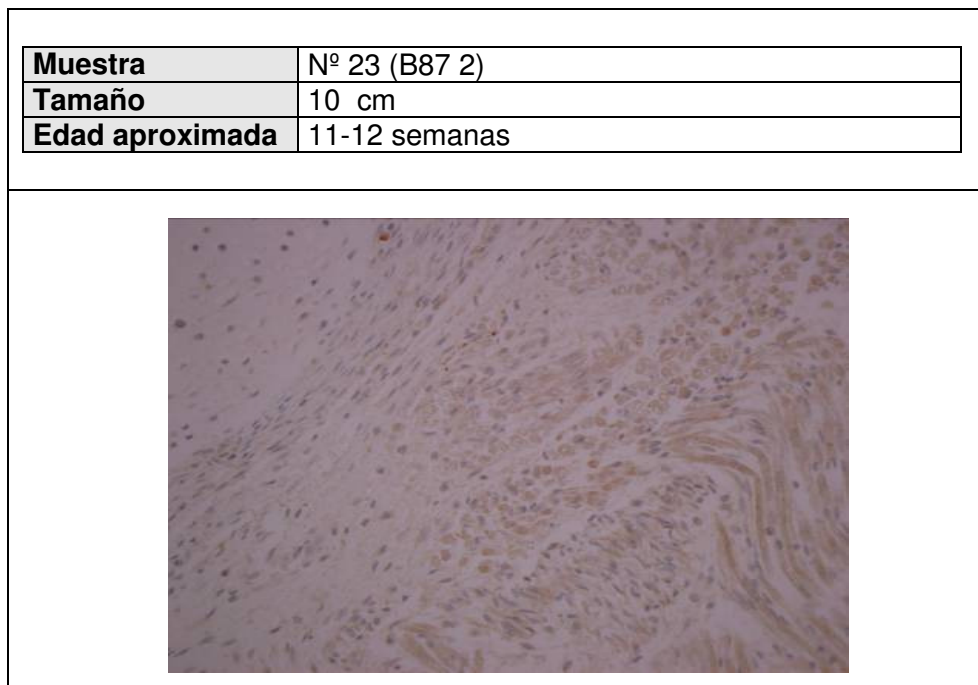
<b>Muestra</b>	Nº 23 (B87 2)
<b>Tamaño</b>	10 cm
<b>Edad aproximada</b>	11-12 semanas



**Figura 52.** Positividad en fibra muscular secundaria con miofibrillas rellanando las fibras (Desmina 10 X 20).

4.2.3.7.  
MyoD1

**Figura 53.** Positividad nuclear en mioblastos y fibras nerviosas MyoD1 (10 X 20).

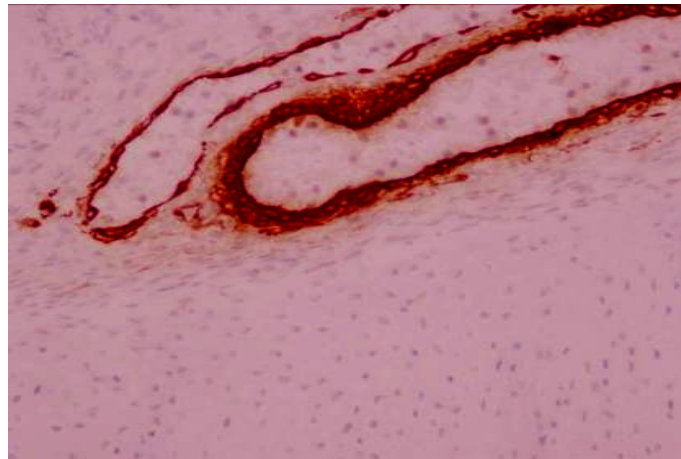
4.2.3.8.  
MyoD1

**Figura 54.** Negatividad nuclear, tenue positividad citoplasmática en fibras musculares. (Myo D1 10 X 20).

4.2.3.9.

Actina ML

<b>Muestra</b>	Nº 17 (B15.842)
<b>Tamaño</b>	7,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	10-11 semanas

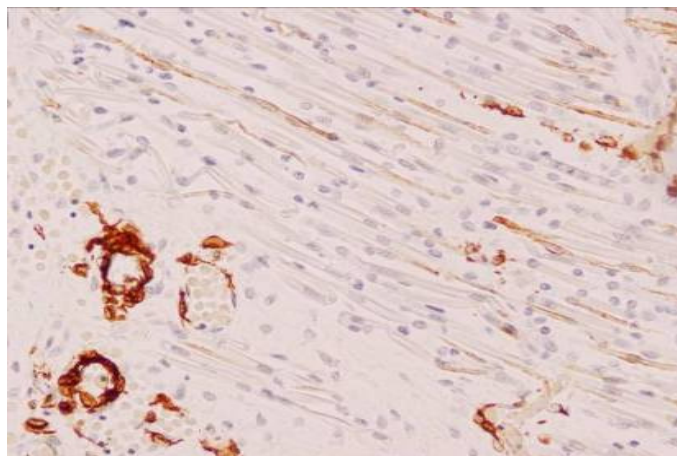


**Figura 55.** Positividad contorno vascular (Actina ML 10 X 20).

4.2.3.10.

Actina ML

<b>Muestra</b>	Nº 23 (B87 2)
<b>Tamaño</b>	10 cm
<b>Edad aproximada</b>	11-12 semanas

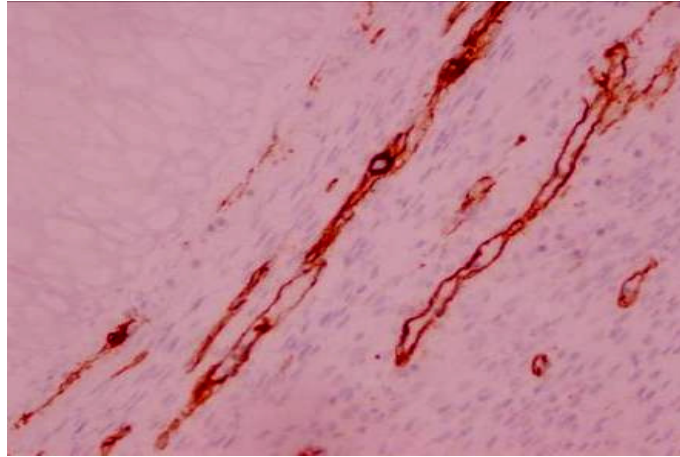


**Figura 56.** Positividad en contorno vascular y ocasional miotúbulo (Actina ML 10 x 20).

4.2.3.11.

CD31

<b>Muestra</b>	Nº 17 (B15.842)
<b>Tamaño</b>	7,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	10-11 semanas

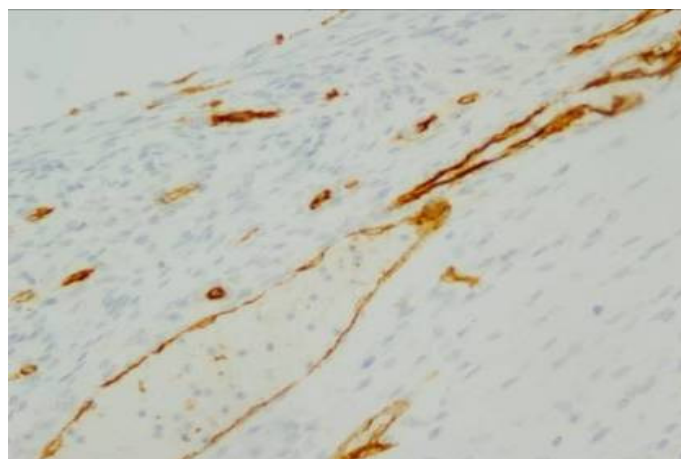


**Figura 57.** Positividad pared vascular (CD31 10 X 20).

4.2.3.12.

CD31

<b>Muestra</b>	Nº 23 (B87 2)
<b>Tamaño</b>	10 cm
<b>Edad aproximada</b>	11-12 semanas

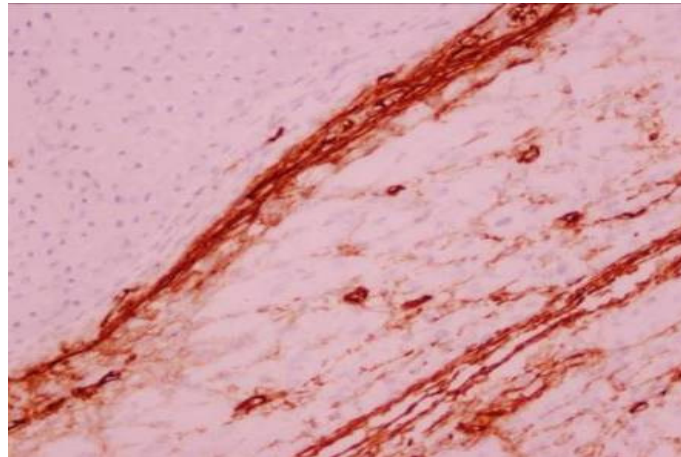


**Figura 58.** Positividad contorno vascular (CD31 10 X 20).

## 4.2.3.13.

## CD34

<b>Muestra</b>	Nº 17 (B15.842)
<b>Tamaño</b>	7,5cm
<b>Edad aproximada</b>	10-11 semanas

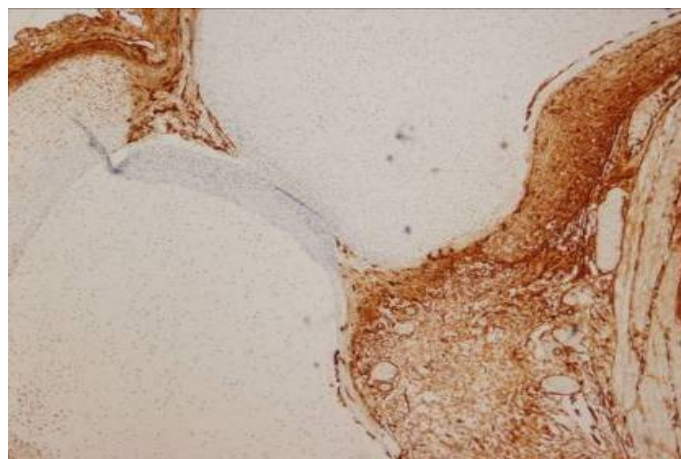


**Figura 59.** Positividad tejido fibroconectivo intercompartmental y pared vascular (CD34 10 X 20).

## 4.2.3.14.

## CD34

<b>Muestra</b>	Nº 23 (B87 2)
<b>Tamaño</b>	10 cm
<b>Edad aproximada</b>	11-12 semanas



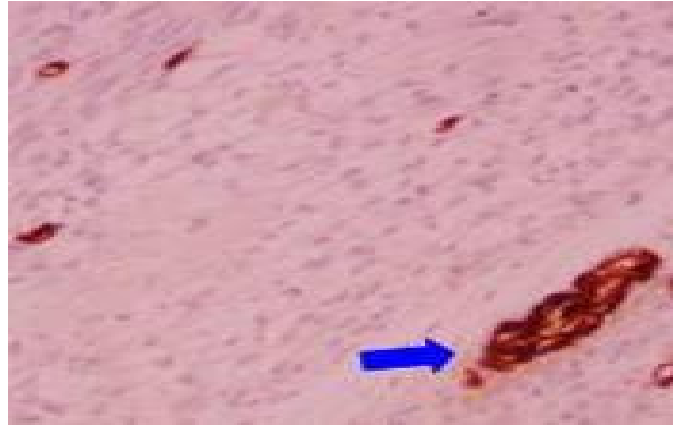
**Figura 60.** Positividad en vainas y tejido conectivo (CD34 10 X 4).



4.2.3.15.

S100

<b>Muestra</b>	Nº 17 (B15.842)
<b>Tamaño</b>	7,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	10-11 semanas

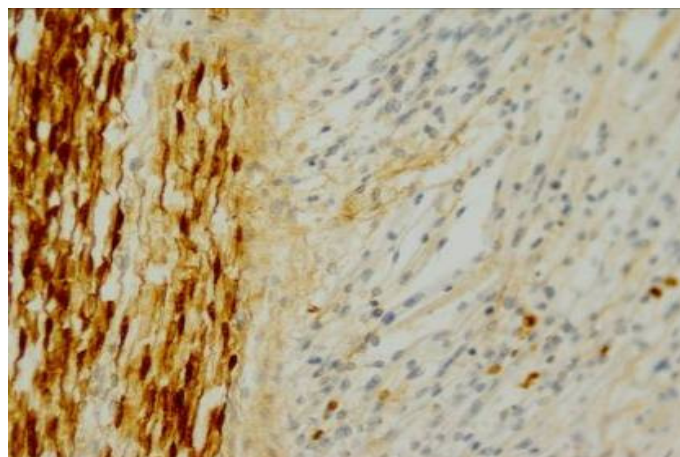


**Figura 61.** Positividad en tejido neural y cartílago (S100 10 X 20).

4.2.3.16.

S100

<b>Muestra</b>	Nº 23 (B87 2)
<b>Tamaño</b>	10 cm
<b>Edad aproximada</b>	11-12 semanas

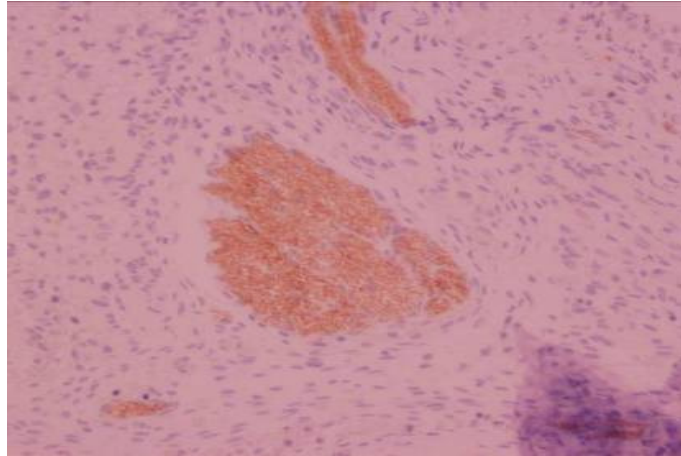


**Figura 62.** Positividad en nervios y en núcleo de alguna célula indiferenciada (S100 10 X 20).

## 4.2.3.17.

## Sinaptofisina

<b>Muestra</b>	Nº 17 (B15.842)
<b>Tamaño</b>	7,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	10-11 semanas

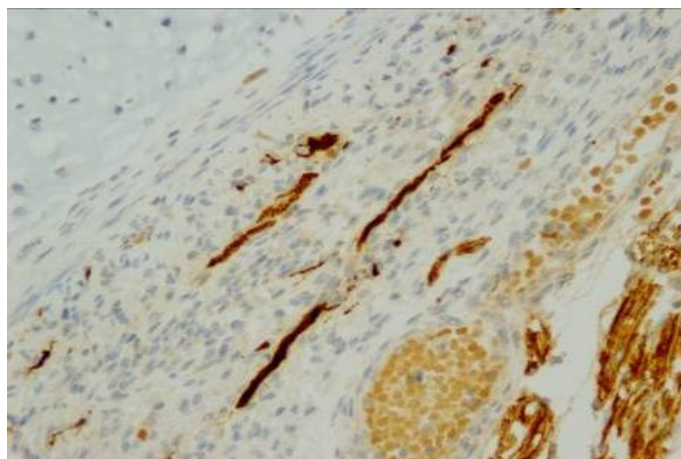


**Figura 63.** Positividad en nervios (Sinaptofisina 10 X 20).

## 4.2.3.18.

## Sinaptofisina

<b>Muestra</b>	Nº 23 (B87 2)
<b>Tamaño</b>	10 cm
<b>Edad aproximada</b>	11-12 semanas

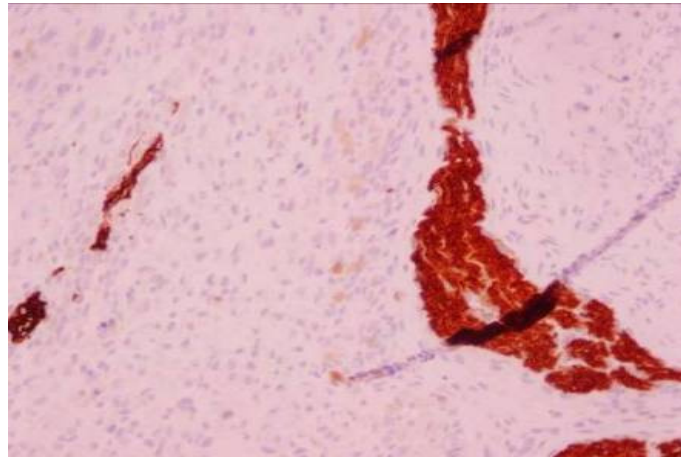


**Figura 64.** Positividad en filamentos neurales (Sinaptofisina 10 X 20).

4.2.3.19.

NFP

<b>Muestra</b>	Nº 17 (B15.842)
<b>Tamaño</b>	7,5 cm
<b>Edad aproximada</b>	10-11 semanas

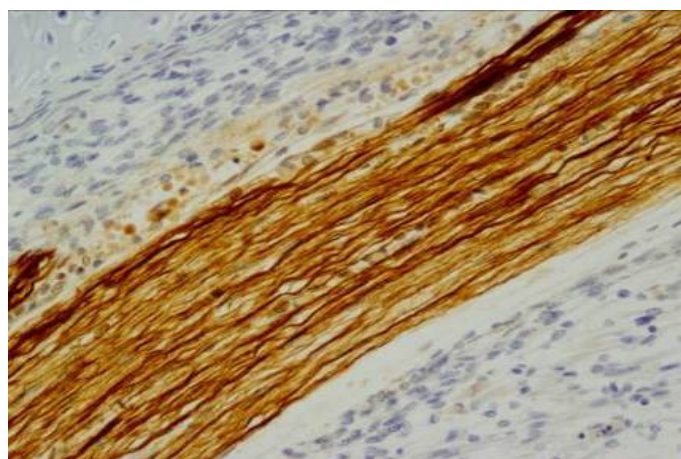


**Figura 65.** Positividad en filetes nerviosos (NFP 10 X 20).

4.2.3.20.

NFP

<b>Muestra</b>	Nº 23 (B87 2)
<b>Tamaño</b>	10 cm
<b>Edad aproximada</b>	11-12 semanas



**Figura 66.** Positividad en estructuras neurales (NFP 10 x 20).

	Muscular	Cartilaginoso	Vascular	Conectivo	Nervioso	Adiposo
Vimentina	++	-	++	++	+	-
Desmina	+++	-	-	-	-	-
MYOD1	+/-	-	-	-	+/-	-
Actina ML		-	++	-	-	
CD31	-	-	++	-	-	-
CD34	-	-	++	+++	-	-
S100	-	+	-	-	+++	-
Sinaptofisina	-	-	-	-	++	-
Neurofilamento	-	-	-	-	+++	-

**Tabla 5.** Resumen de los resultados de la IHQ en el periodo de diferenciación intermedia.

#### 4.2.4. Periodo diferenciación tardía

Como en el periodo anterior, en este periodo también tenemos dos figuras de cada anticuerpo correspondientes a dos fetos de distintas edades. Las primeras figuras de cada anticuerpo se corresponden con cortes de un feto de 18 cm de longitud y las segundas con cortes de un feto de 28 cm. Se puede observar la escasa diferencia entre cada una de ellas, lo que significa que la maduración del tejido es casi completa y el crecimiento es sobre todo en volumen con escasos cambios morfológicos.

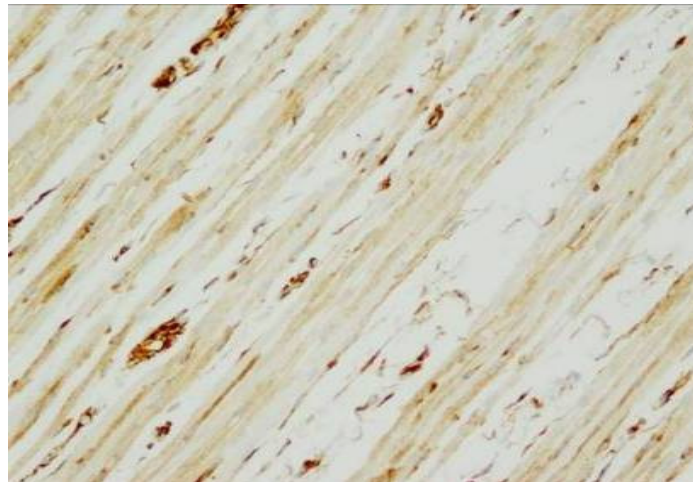
La expresión de los tejidos derivados del mesénquima para la Vimentina disminuye con la maduración tisular. En la figura 67 se observa débil positividad de la Vimentina en la periferia de la fibra muscular con positividad más marcada de los vasos. La Desmina marca intensamente las fibras y sus estriaciones, siendo negativa en el resto de los tejidos (Fig. 69 y 70). La MyoD1 se negativiza en la fibra muscular esquelética ya en el feto de 18 cm (Fig. 71) y continua negativa con el posterior desarrollo (Fig. 72). Dentro de los

marcadores vasculares, la Actina ML marca la capa muscular en vasos mejor desarrollados (Figs. 73 y 74). El CD31 continúa con afinidad para el endotelio vascular, aunque con expresión debilitada (Fig. 75). En la figura 76, este anticuerpo además de expresarse en el contorno vascular, tiñe el cartílago. El CD34, aparte de los vasos, delimita el tejido conjuntivo intramuscular (Fig.77 y 78). El S100 en este periodo tiñe los melanocitos y el tejido adiposo, aparte de mantener su afinidad por los nervios, igual que los otros dos marcadores nerviosos, la Sinaptofisina y los NFP (Figs. 79, 80, 81, 82, 83 y 84).

#### 4.2.4.1.

##### Vimentina

<b>Muestra</b>	Nº 34 (B18 735 2)
<b>Tamaño</b>	18 cm
<b>Edad aproximada</b>	18-19 semanas

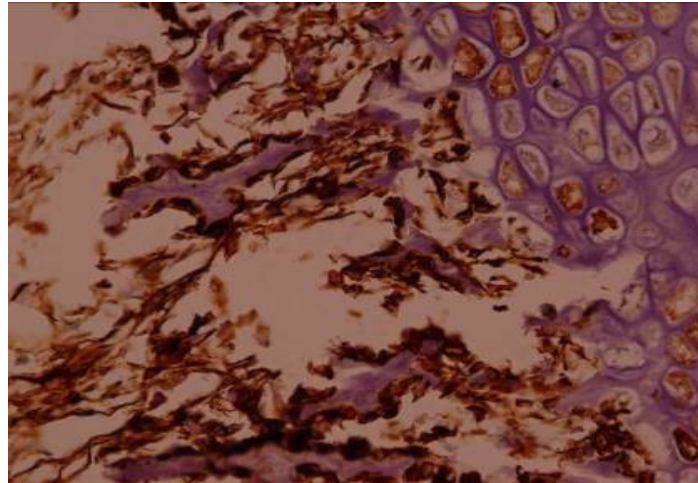


**Figura 67.** Positividad en alguna fibra muscular y vasos (Vimentina 10 X 20).

4.2.4.2.

Vimentina

<b>Muestra</b>	Nº 42 (B N 91)
<b>Tamaño</b>	28 cm
<b>Edad aproximada</b>	29-30 semanas

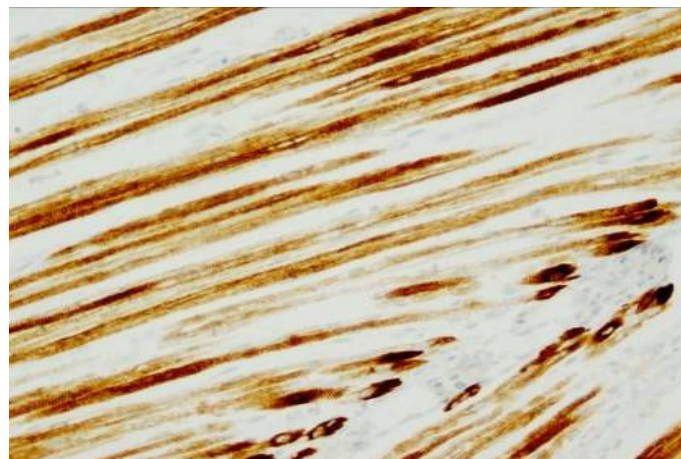


**Figura 68.** Positividad matriz osea (Vimentina 10 X 20).

4.2.4.3.

Desmina

<b>Muestra</b>	Nº34 (B18 735 2)
<b>Tamaño</b>	18 cm
<b>Edad aproximada</b>	18-19 semanas

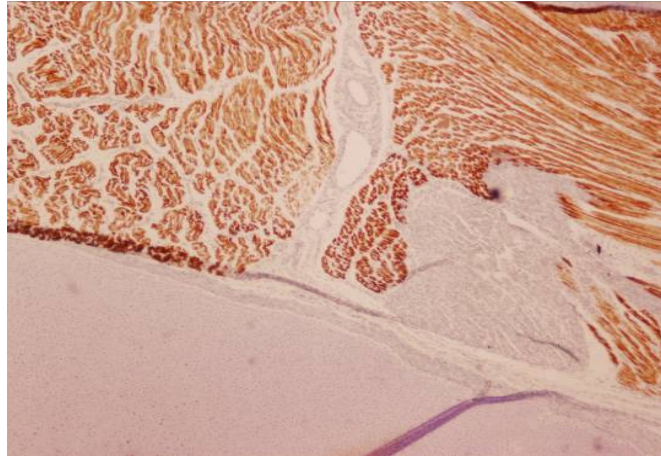


**Figura 69.** Positividad en fibras musculares, algunas con estriaciones transversales (Desmina 10 x 20).

4.2.4.4.

Desmina

<b>Muestra</b>	Nº 42 (B N 91)
<b>Tamaño</b>	28 cm
<b>Edad aproximada</b>	29-30 semanas

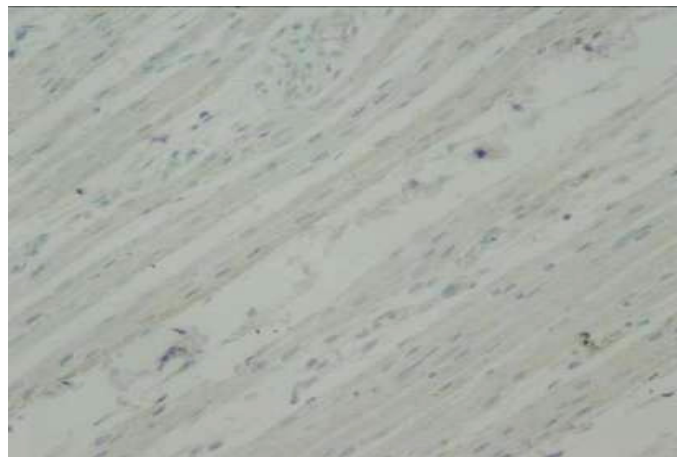


**Figura 70.** Positividad en músculo esquelético. Pared vascular negativa (Desmina 10 X 4).

4.2.4.5.

MyoD1

<b>Muestra</b>	Nº 34 (B18 735 2)
<b>Tamaño</b>	18 cm
<b>Edad aproximada</b>	18-19 semanas

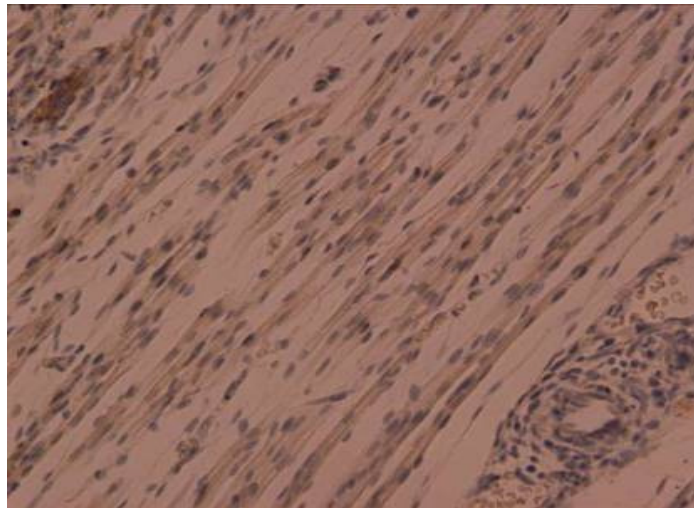


**Figura 71.** Negatividad muscular tanto nuclear como citoplasmática (Myo D1 10 X 20).

4.2.4.6.

MyoD1

<b>Muestra</b>	Nº 42 (B N 91)
<b>Tamaño</b>	28 cm
<b>Edad aproximada</b>	29-30 semanas

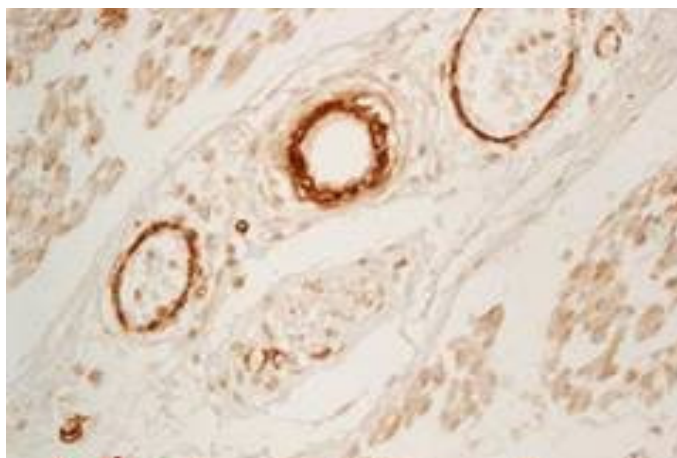


**Figura 72.** Negatividad para músculo estriado diferenciado (MyoD1 10 X 20).

4.2.4.7.

Actina ML

<b>Muestra</b>	Nº 34 (B18 735 2)
<b>Tamaño</b>	18 cm
<b>Edad aproximada</b>	18-19 semanas



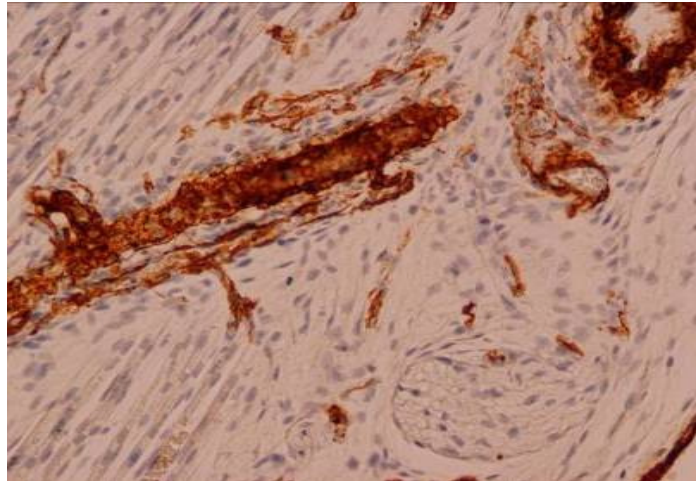
**Figura 73.** Positividad en vasos y alguna fibra aislada (Actina ML 10 X 20).



4.2.4.8.

Actina ML

<b>Muestra</b>	Nº 42 (B N 91)
<b>Tamaño</b>	28 cm
<b>Edad aproximada</b>	29-30 semanas

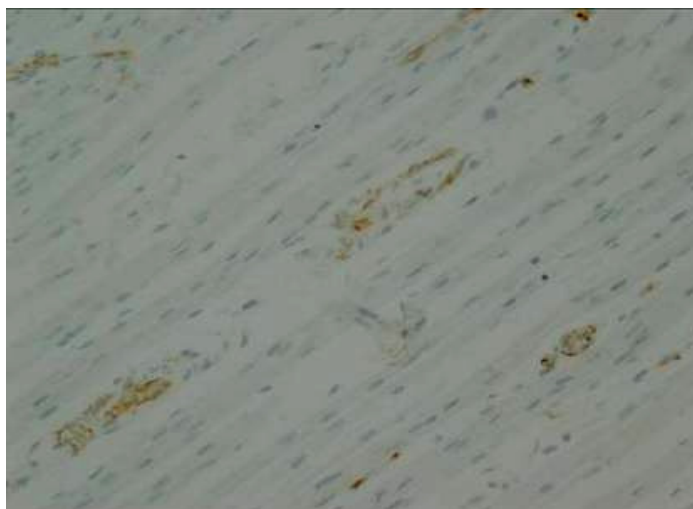


**Figura 74.** Positividad contorno vascular (Actina ML 10 X 20).

4.2.5.9.

CD31

<b>Muestra</b>	Nº 34 (B18 735 2)
<b>Tamaño</b>	18 cm
<b>Edad aproximada</b>	18-19 semanas

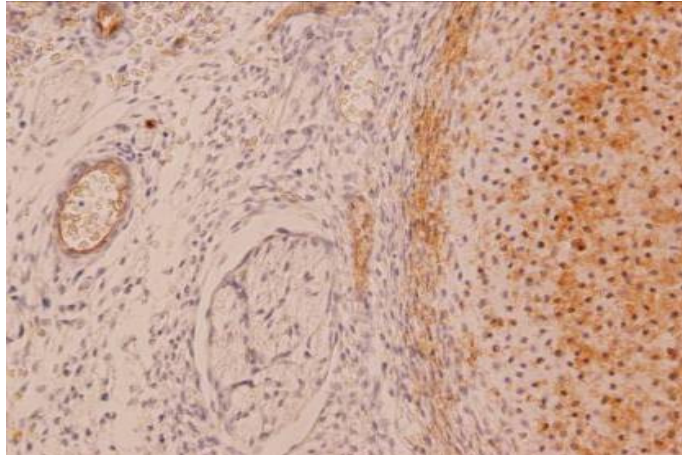


**Figura 75.** Positividad contorno vascular (CD31 10 X 20).

4.2.4.10.

CD31

<b>Muestra</b>	Nº 42 (B N 91)
<b>Tamaño</b>	28 cm
<b>Edad aproximada</b>	29-30 semanas



**Figura 76.** Positividad contorno vascular y cartílago (CD31 10 X 20).

4.2.4.11.

CD34

<b>Muestra</b>	Nº 34 (B18 735 2)
<b>Tamaño</b>	18 cm
<b>Edad aproximada</b>	18-19 semanas

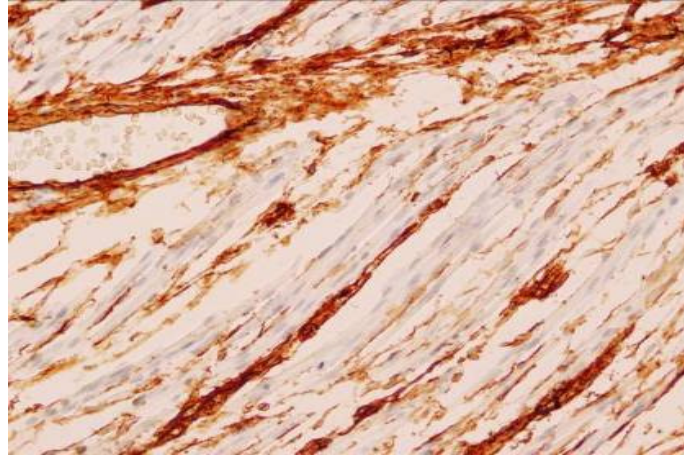


**Figura 77.** Positividad en fascia y algún pequeño vaso intramuscular (CD34 10 X 20).

4.2.4.12.

CD34

<b>Muestra</b>	Nº 42 (B N 91)
<b>Tamaño</b>	28 cm
<b>Edad aproximada</b>	29-30 semanas

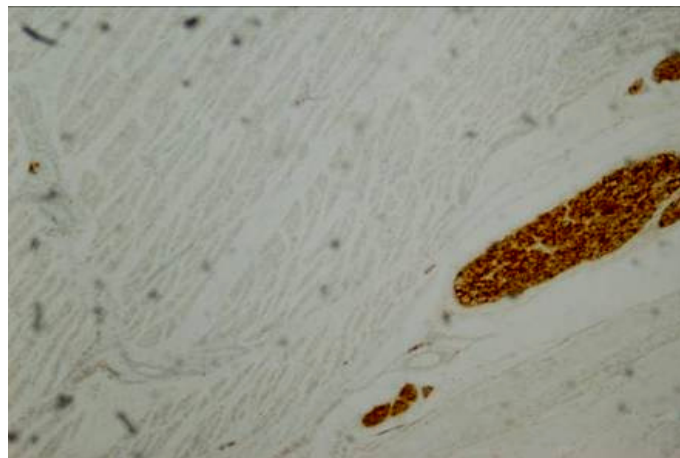


**Figura 78.** Positividad tejido fibroconectivo intermuscular y vascular (CD34 10 X 20).

4.2.3.13.

S100

<b>Muestra</b>	Nº 34 (B18 735 2)
<b>Tamaño</b>	18 cm
<b>Edad aproximada</b>	18-19 semanas

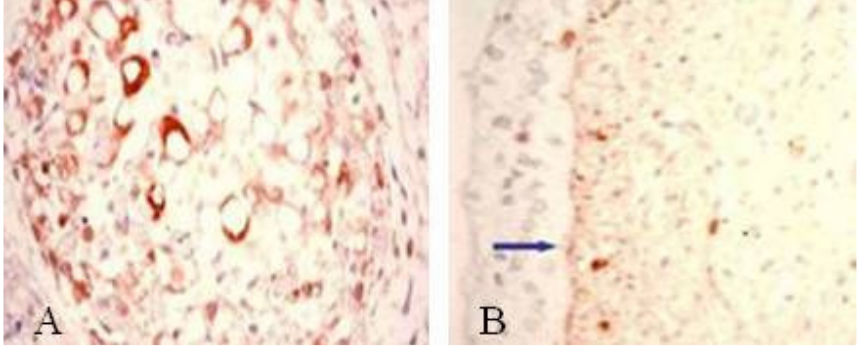


**Figura 79.** Positividad tejido neural (S100 10 X 200).

4.2.4.14.

S 100

<b>Muestra</b>	Nº 42 (B N 91)
<b>Tamaño</b>	28 cm
<b>Edad aproximada</b>	29-30 semanas

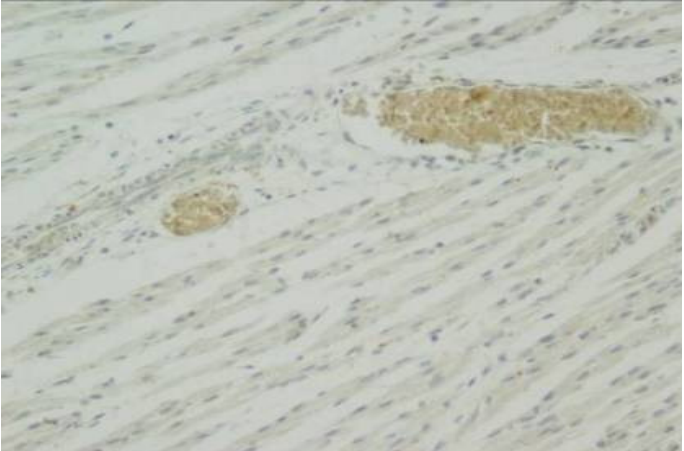
  


**Figura 80.** Positividad tejido adiposo y melanocitos. S 100 10 X 20 (A) y S 100 10 X 4 (B).

4.2.4.15.

Sinaptofisina

<b>Muestra</b>	Nº 34 (B18 735 2)
<b>Tamaño</b>	18 cm
<b>Edad aproximada</b>	18-19 semanas

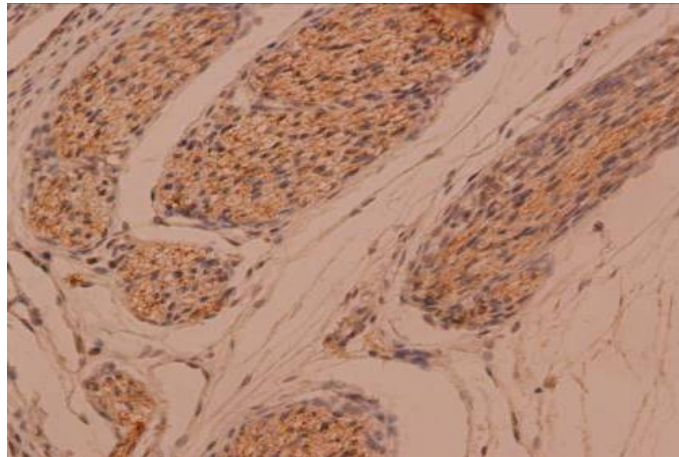
  


**Figura 81.** Positividad granular en tejido neural (Sinaptofisina 10 x 20).

4.2.4.16.

Sinaptofisina

<b>Muestra</b>	Nº 42 (B N 91)
<b>Tamaño</b>	28 cm
<b>Edad aproximada</b>	29-30 semanas

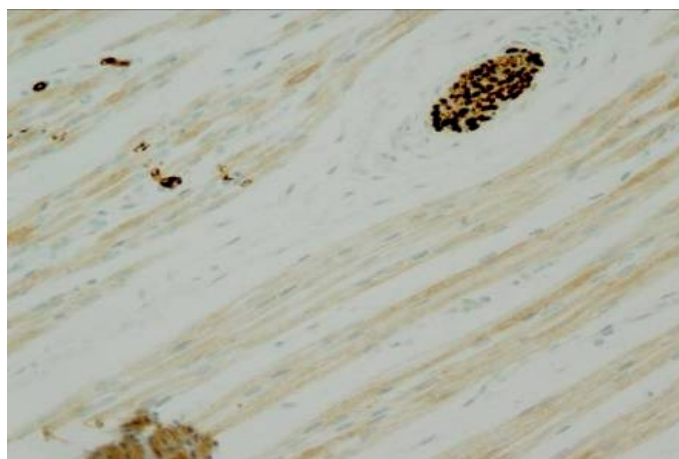


**Figura 82.** Positividad tejido neural (Sinaptofisina 10 X 20).

4.2.4.17.

NFP

<b>Muestra</b>	Nº 34 (B18 735 2)
<b>Tamaño</b>	18 cm
<b>Edad aproximada</b>	18-19 semanas

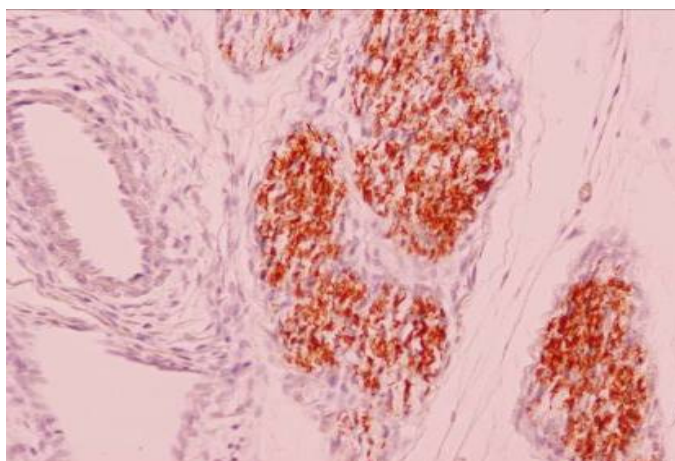


**Figura 83.** Positividad neural (NFP. 10 X 20).

4.2.4.18.

NFP

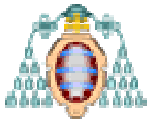
<b>Muestra</b>	Nº 42 (B N 91)
<b>Tamaño</b>	28 cm
<b>Edad aproximada</b>	29-30 semanas



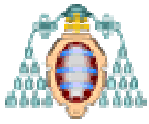
**Figura 84.** Positividad granular fibras nerviosas (NFP 10 X 20).

	Muscular	Cartilaginoso	Vascular	Conectivo	Nervioso	Adiposo
Vimentina	+	+/-	++	+	+	-
Desmina	+++	-	-	-	-	-
MYOD1	-	-	-	-	-	-
Actina ML		-	++	-	-	
CD31	-	+/-	++	-	-	-
CD34	-	-	++	+++	-	-
S100	-	+	-	-	+++	++
Sinaptofisina	-	-	-	-	++	-
Neurofilamento	-	-	-	-	+++	-

**Tabla 6.** Resumen de los resultados de la IHQ en el periodo de diferenciación tardía.



## V. DISCUSIÓN



Una de las primeras limitaciones que existen a la hora de estudiar la diferenciación tisular durante la embriogénesis humana es la obtención de las muestras. La única fuente de la que disponemos procede de los abortos espontáneos y en muchos casos el material obtenido de los mismos no presenta unas condiciones de preservación suficientes. Utilizando el material procedente de abortos en distintas semanas de gestación podemos estudiar el proceso de diferenciación tisular. Existen muchos textos sobre el desarrollo del embrión desde un punto de vista anatómico, si bien los cambios que acontecen a nivel celular con la maduración tisular son procesos menos estudiados. La inmunohistoquímica nos brinda la posibilidad de estudiar la adquisición de marcadores diferenciadores de los distintos tipos celulares en un estadio en el que las células presentan marcado monomorfismo, y su estudio histológico mediante técnicas clásicas no nos permiten distinguir unas de otras. Esta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. La reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que produce coloración. Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como Biotina o proteína A. El espectro de anticuerpos disponibles comercialmente crece día a día y actualmente es posible encontrar marcadores para una amplia gama de antígenos.

Las ventajas de esta técnica es que permite una localización muy exacta de las reacciones, siendo la tinción permanente, estable y puede visualizarse al microscopio de luz. El material así estudiado puede archivar por años sin pérdida de la intensidad de la reacción. Los anticuerpos monoclonales han permitido aumentar la especificidad, sensibilidad y gama de esta técnica.

Para la interpretación de los resultados es imprescindible una precisa estandarización de la técnica y realizar controles de calidad. Dependiendo del tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal), material disponible (fresco, congelado o fijado) y antígeno a estudiar (citoplasmático, de membrana y nuclear) variará el método de procesado. Actualmente existen sistemas



automatizados que permiten la tinción de un gran número de casos simultáneamente con la ventaja de pasos definidos y estandarización de las variables usuales con costo relativamente bajo y en mucho menor tiempo.

La utilidad de la IHQ no se limita a diferenciar antígenos con fines diagnósticos. También, utilizando marcadores tumorales, identifica productos de oncogenes y de genes supresores con valor pronóstico en determinados tipos de cáncer. La interpretación de los resultados, de cualquier forma, ha de ser evaluada en conjunto con los hallazgos clínico-patológicos, siendo la experiencia de investigador fundamental para evitar caer en interpretaciones erróneas.

El término mesénquima engloba todo el mesodermo no epitelial indiferenciado de los embriones, siendo el precursor del tejido conectivo, vascular, cartilaginoso, esquelético, muscular, adiposo y hematopoyético. Las extremidades están formadas, en su mayoría, por tejidos procedentes del mesénquima. Un modo de estudiarlo es observando los cambios histológicos que sufren los tejidos de las extremidades en los embriones.

La yema de las futuras extremidades aparece entre la 3ª y 4ª semana de vida embrionaria como una proyección de la parte dorsal de la somatopleura, algo ventral a los somitas el de las extremidades superiores y un poco más caudal el de las inferiores<sup>20</sup>. Cada yema, por otra parte, consiste en un mesénquima histológicamente indiferenciado, cubierto por células de origen ectodérmico.

Es imposible distinguir diferentes tipos celulares en el mesénquima de la yema inicial únicamente mediante criterios morfológicos. No obstante, se encuentran células mesenquimatosas de distintos orígenes. Al principio, el mesénquima de la yema del miembro está constituido en exclusiva por células derivadas del mesodermo de la placa lateral. Estas dan origen al esqueleto, al tejido conjuntivo y a algunos vasos sanguíneos. Las células mesenquimatosas derivadas de los somitas migran hacia la yema del miembro como precursoras de las células musculares. Otras células migratorias provienen de la cresta

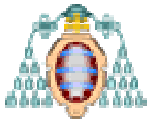
neural y constituyen en última instancia las células de Schwann de los nervios, los nervios sensoriales y los melanocitos<sup>118</sup>.

El desarrollo de la extremidad se produce como resultado de las interacciones continuas entre los componentes mesodérmico y ectodérmico de la yema del miembro. Según avanza la embriogénesis aparecen células con rasgos de diferenciación, como los condroblastos, mioblastos, angioblastos, osteoblastos, fibroblastos y adipoblastos. Estas células presentan características histológicas propias del tejido adulto que posteriormente formarán.

Como comentamos anteriormente, el desarrollo del mesénquima desde un punto de vista histológico es un tema poco estudiado y la utilización de la IHQ para tal fin diferencia de una forma más precisa los distintos tejidos derivados del mismo, así como determinadas características que de otra forma serían inapreciables.

Establecer cuatro periodos de maduración del mesénquima durante la gestación es una forma de simplificar el proceso de la embriogénesis. Estos periodos se sobreentiende que son ficticios puesto que el desarrollo es un proceso continuo y un mismo tejido presenta zonas en distintas fases de maduración dependiendo del sitio escogido.

Los periodos los hemos establecidos reuniendo características histológicas comunes de cada etapa, si bien se solapan entre ellas por lo comentado anteriormente. Denominamos al primer periodo como *periodo de indiferenciación*, que correspondería a embriones con un tamaño aproximado de entre 5 mm y 15 mm (estadio 14 a 17) y entre las semanas 4<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup> de gestación aproximadamente. Histológicamente las extremidades están formadas de mesénquima indiferenciado rodeado en su mayor parte de una sola capa de epitelio formado por células cuboidales. En el extremo de cada esbozo de la extremidad, el ectodermo presenta un engrosamiento para formar una cresta ectodérmica apical (CEA). La CEA, una estructura ectodérmica



multicapa, es inducida por el mesénquima subyacente y ejerce una influencia inductora del crecimiento en dirección próximo-distal de la extremidad<sup>119-120</sup>.

Dentro del mesénquima, el único elemento claramente diferenciable es la presencia de los centros precondrales, formados por células de núcleos redondos de tamaño superior al de las células mesenquimales indiferenciadas y separadas por abundante matriz clara. La S100 tiñe de forma tenue los núcleos de los condroblastos y, además, marca intensamente las estructuras nerviosas. Este hallazgo confirmaría a esta proteína como marcador de células precursoras del tejido condral. También se observa algún espacio tapizado por células planas (capilares) con hematíes nucleados intraluminalmente.

Para diferenciar los vasos hemos utilizado los anticuerpos frente a los antígenos de membrana CD31 y CD34, observando que estos están presentes en el endotelio vascular en fases precoces de maduración. Ya en estadios muy tempranos del desarrollo de la extremidad existe una amplia red vascular constituida por numerosos capilares incluidos dentro del mesénquima. Se observan aéreas relativamente avasculares alrededor de los centros precondrales que darán lugar posteriormente a los esbozos cartilagosos de los huesos. También existe una relativa avascularidad en las regiones inmediatamente inferiores al epitelio. Algún vasos, este periodo de inmadurez de la extremidad, posee capa muscular, como pone de manifiesto su positividad para la Actina ML. Estos vasos representarían los principales conductos vasculares, que cambian de manera continua conforme la extremidad va desarrollándose.

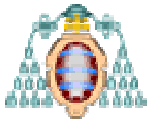
La MyoD1 y Desmina, ambos marcadores de diferenciación muscular, tienen una distribución muy similar a la anteriormente descrita, lo que implica que ambos son marcadores precoces del músculo estriado y que la segunda no se expresa en regiones positivas para la Actina ML, indicando que durante la embriogenia precoz no sería un marcador diferenciador del músculo liso vascular. En esta fase, las células premiogénicas son indistinguibles por su morfología de otras células mesénquimatosas.

La presencia de estructuras alargadas compuestas de células fusiformes positivas para marcadores neurales, como la S100, la Sinaptofisina y los NFP, pone de manifiesto cómo la migración de los axones que se originan en la médula espinal entran en la yema del miembro en un estadio precoz del desarrollo (durante la quinta semana aproximadamente)<sup>121</sup>.

Al segundo periodo lo denominamos como *periodo de diferenciación temprana*. En este periodo el embrión tiene un tamaño de entre 1,5 cm y 4 cm y se corresponde a edades de gestación comprendidas entre finales de la sexta y la octava semana. Macroscópicamente, al final de este periodo se pueden observar las flexuras de codos y rodillas y los dedos están separados y son independientes. La epidermis posee más de una capa de células con presencia de tejido laxo subepidérmico y aumenta, con respecto al periodo anterior, el número de células fusiformes con núcleos centrales que pueden corresponder a miofibroblastos o fibroblastos. Dichas células adquieren cierto grado de polarización.

Los esbozos cartilagosos de los huesos ocupan gran parte del mesénquima con células S100 positivas. Aparecen los mioblastos y los miotubulos, células multinucleadas positivas para la Desmina en su periferia. Los vasos adquieren mayor tamaño y muchos de ellos desarrollan una capa muscular mejor diferenciada con positividad para la Actina ML. Se identifica tejido cartilaginoso separado por mesénquima indiferenciado (mesénquima articular) y, bordeando a éste, un tejido conjuntivo denso positivo para el CD34 que representa el pericondrio y el futuro periostio. Los nervios son positivos para los NFP de forma granular y la Sinaptofisina y la S100 continúan marcando su periferia.

Al tercer periodo lo denominamos *periodo de diferenciación intermedia* y comprende a fetos de unos tamaños que oscilan entre 5 y 10 cm a partir de la novena semana de gestación. El periodo embrionario termina al final de la octava semana. En este momento están presentes los esbozos (primordios) de todas las estructuras esenciales. El periodo fetal, que se extiende desde la

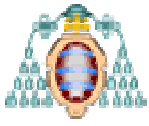


novena semana en adelante, se caracteriza por el crecimiento y elaboración de las estructuras. Se observa un aumento de los miotúbulos con algunas miofibrillas con pequeños núcleos excéntricos y, a medida que avanza la edad de gestación, aparecen fibras agrupadas en fascículos, algunas con el sarcolema totalmente relleno de miofibrillas. Con la Desmina como marcador diferenciador se aprecian las estriaciones transversales de la fibra muscular y la MYoD1 pierde positividad nuclear en la fibra desarrollada, aunque curiosamente capta en su periferia.

Una característica específica de la diferenciación del esqueleto de los miembros es la formación de las articulaciones, proceso que ocurre al principio del periodo fetal coincidiendo con la diferenciación funcional de los músculos de las extremidades y su formación<sup>122</sup>. Esta se produce por la licuefacción del mesénquima intercartilaginosa, comenzándose a formar la cavidad articular. La formación de la articulación queda patente por primera vez cuando unas bandas de células muy condensadas cruzan una columna precartilaginosa. A la condensación le sucede la muerte celular y cambios en la matriz de la región articular. Otras condensaciones del mesénquima darán lugar a la cápsula, ligamentos y tendones<sup>122</sup>. La Vimentina continúa siendo positiva para la mayor parte de los tejidos, pero no para el esbozo cartilaginoso de los huesos, que con la maduración tisular ha sustituido este filamento intermedio de su citoplasma. Podemos concluir que son los condrocitos las células de origen mesenquimal que primero pierden la Vimentina de su citoplasma. En este periodo comienza la osificación endcondral a partir del primordio cartilaginoso.

Debajo de la epidermis aparece un tejido celular subcutáneo formado por tejido conectivo muy laxo con células estrelladas y escasos fibroblastos. Sin embargo, no existen anejos cutáneos ni presencia de tejido adiposo bien constituido.

Por último, denominamos al cuarto periodo como *periodo de diferenciación tardía*, donde los fetos miden más de 11 cm de longitud. Al principio del tercer mes, la dermis en desarrollo experimenta una transición desde su forma



embrionaria muy celular a un estado que se caracteriza por la diferenciación de las células mesenquimatosas en fibroblastos y por la formación creciente de una matriz fibrosa. En este periodo tiene lugar una proliferación vascular del área subepidérmica con la aparición de adipoblastos con vacuolas intracitoplasmáticas. La formación de lóbulos adiposos tiene lugar debajo de un tejido laxo subepidérmico. Un hallazgo interesante es la positividad de este tejido para la S100, confirmando su utilización como marcador diferenciador de tumores de partes blandas derivados de tejido adiposo. La piel presenta anejos cutáneos y continúa el proceso de osificación endondral del cartílago. Los fascículos nerviosos y musculares se diferencian por el tejido conjuntivo que los delimita y los vasos adquieren una capa muscular mejor desarrollada. A partir de este momento el crecimiento es principalmente en volumen, con pocos cambios histológicos y tejidos bastante diferenciados.

Aunque no sea objeto de este trabajo, el estudio del mesénquima embrionario podría servir como modelo a la hora de clasificar los sarcomas de partes blandas (SPB), que son procesos tumorales mesenquimales malignos que se originan en los tejidos no epiteliales extraesqueléticos, excluido el sistema reticuloendotelial, la glía y los tejidos de soporte de algunos órganos parenquimatosos. Por convenio, los tejidos que se incluyen son la musculatura voluntaria y los tendones, el tejido adiposo, el tejido conectivo, los vasos que irrigan a los tejidos anteriormente citados y los nervios periféricos, dado que se presentan como masas en el tejido blando. Todos representan un grupo de tumores altamente heterogéneo que se clasifica en base a su histología con respecto al tejido adulto al cual se parecen. Lipomas y liposarcomas, son por ejemplo, tumores que reproducen en diversos grados el tejido adiposo normal. Los angiosarcomas se clasifican como tales por contener células que recuerdan al endotelio vascular<sup>123</sup>.

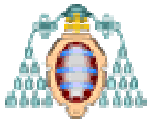
Las clasificaciones histológicas actuales de los SPB, fundamento del pronóstico de la enfermedad, se basan en la línea de diferenciación tumoral, es decir, en el tipo de tejido formado por el tumor más que en el tipo de tejido del que proviene<sup>124</sup>. Históricamente se asumía que todas las células de un tumor derivaban de una única célula tumoral que se multiplicaba una y otra vez de

forma ininterrumpida produciendo células idénticas a la original, que en su conjunto formaban la masa del tumor. Como todas las células del tumor son clones de la célula original, se pensaba que cada clon poseía las mismas características de su progenitora, incluyendo su capacidad para proliferar y metastatizar. Sin embargo, se sabe que en muchos tipos de cáncer las células se comportan y se diferencian unas de otras tanto dentro del mismo tumor como en tumores semejantes.

La teoría de la célula madre cancerosa mantiene la existencia de una pequeña subpoblación celular dentro del tumor, similar a la de las células madre normales, con capacidad para autorreproducirse. Estas pocas células se podrían dividir asimétricamente, generando clones de células madre y otras con un grado mayor de diferenciación que, al dividirse posteriormente, formarían la mayor parte de la masa tumoral. Las células madre cancerosas serían las responsables de iniciar y mantener el crecimiento del tumor, y su erradicación parece necesaria para un buen resultado terapéutico<sup>125</sup>.

En la misma línea a la descrita, Weismann, estableciendo paralelismos entre células madre cancerosas y células madre normales, ha sugerido que la tumorigénesis se puede explicar como una organogénesis aberrante<sup>126</sup>. Ambos tipos de células poseen las capacidades de autorrenovación, proliferación extensa y formación de tejidos diferenciados. Sin embargo, las células normales actúan de manera muy regulada y estricta, mientras que las cancerosas lo hacen de forma anárquica. Debido al papel de las células madre en la génesis tumoral, muchos tumores reflejan aspectos físicos y funcionales similar al del tejido del cual supuestamente proceden<sup>127</sup>.

Por otro lado, el valor pronóstico de la clasificación histológica de los sarcomas de partes blandas es limitado basándose solo en el diagnóstico realizado en secciones teñidas con HxE. Es indispensable el uso de técnicas complementarias como la inmunohistoquímica y/o patología molecular.



La IHQ se ha convertido en una técnica auxiliar de suma importancia aplicada al diagnóstico de tumores<sup>128,129</sup>. Con respecto a los SPB, constituye, conjuntamente con la microscopía electrónica y las modernas técnicas de patología molecular, un arma indispensable que en manos de patólogos expertos en su interpretación aporta datos de importante valor, no solo diagnóstico, sino también pronóstico y/o de orientación terapéutica<sup>130</sup>.

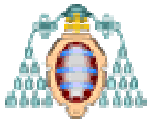
Con todo, si bien en nuestro trabajo únicamente pretendimos estudiar el desarrollo del mesénquima del embrión utilizando la IHQ para determinar la adquisición de marcadores diferenciadores por parte de las células inmaduras embrionarias, las similitudes del tejido embrionario y su diferenciación con las características histológicas de los SPB podría justificar la continuación de la investigación con la base de nuestros resultados.

## **5.2. Marcadores**

Existen marcadores tempranos diferenciadores de estructuras cuando las células presentan marcado monomorfismo, como son los marcadores vasculares y nerviosos. Otros tienen mayor representatividad con la maduración tisular, como el CD34, y otros se atenúan con la diferenciación, como la Vimentina y la MyoD1.

La Vimentina se utiliza en el laboratorio para identificar cualitativamente las células de origen mesenquimal. La Vimentina se expresa de forma ubicua en todas las células durante la embriogenia precoz y en muchas células se va sustituyendo de forma gradual por los filamentos intermedios específicos<sup>131-132</sup>. Está presente en fibroblastos, condrocitos, células endoteliales y células de músculo liso vascular, entre otras. En algunos tejidos mesenquimales la Vimentina se coexpresa con los filamentos intermedios específicos de la célula (p. ej. coexpresión de Vimentina y Desmina en las células musculares)<sup>133-134</sup>. Como muestra la característica de expresarse en tejidos bien fijados, puede usarse como control interno de la fijación de los tejidos. Por tanto, sirve para identificar la pérdida de antigenicidad durante el procesado<sup>135</sup>.





En nuestro estudio observamos que, al principio, en el embrión de 5 semanas, todas las células derivadas del mesenquima expresan de forma intensa la proteína, coexpresándose con el resto de los marcadores utilizados. Con la maduración su expresión se debilita. Continúa marcando la fibra muscular estriada, si bien de forma menos intensa que la Desmina, que pasa a sustituirla como filamento intermedio principal. Esto lo observamos en el feto mayor de 7 cm durante la novena semana de gestación. Un proceso similar ocurre durante el desarrollo del músculo cardiaco, con aumento de la proporción de Desmina y disminución de la Vimentina en el citoplasma de la fibra muscular con la maduración tisular. Kim HD estudió en 1996 como variaba la expresión de Desmina y Vimentina en el músculo cardiaco fetal. En su estudio concluye que la Desmina aumenta su expresión desde el feto de nueve semanas de gestación hasta el recién nacido y también varía el patrón citoplasmático de la misma, pasando de una expresión perinuclear a rellenar la fibra más adelante<sup>136</sup>. La Vimentina por el contrario disminuye a lo largo de la gestación prácticamente desapareciendo su expresión a partir de la semana quince<sup>136</sup>.

El cartílago, en un principio positivo para la Vimentina, se negativiza pronto. En el feto de 18 semanas la fibra estriada mantiene positividad para este filamento si bien está atenuada siendo mayor su expresión en la pared vascular. Al respecto, Gabbiani publica que incluso dentro de un mismo tejido, como el muscular liso, la composición intracelular de los filamentos intermedios varía dependiendo de su localización y maduración<sup>137</sup>. Este autor estudió la composición de filamentos intermedios en la célula muscular lisa (CML) en diferentes localizaciones, encontrando que la expresión de Vimentina y Desmina variaba enormemente dependiendo de si pertenecía a músculo liso vascular o del tracto respiratorio, urinario y digestivo<sup>137</sup>. También dentro de los vasos sanguíneos, la CML varía en su contenido de estas proteínas dependiendo del tamaño del vaso, de su localización anatómica y del grado de maduración.

En resumen, la Vimentina se expresa de forma ubicua en todas las células durante la embriogenia precoz y en muchas células se va sustituyendo de

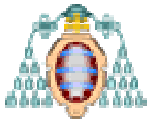
forma gradual por los filamentos intermedios específicos, aunque en otros se mantiene coexpresándose con estos últimos.

La Desmina es la proteína de los filamentos intermedios asociada a la diferenciación del músculo liso y esquelético. Raramente se expresa por los miofibroblastos. En el músculo esquelético se localiza en la zona Z, entre las miofibrillas, donde sirve en apariencia como material de unión para el aparato contráctil<sup>138</sup>. En el músculo liso se asocia a los cuerpos densos citoplasmáticos y a las placas densas subplasmalémicas. La Desmina puede encontrarse también en células no musculares, como la célula reticular fibroblástica del ganglio linfático<sup>139-40</sup>, los fibroblastos submesoteliales<sup>141</sup> o las células del estroma endometrial<sup>142</sup>. Se encuentra entre los genes estructurales musculares que se expresan más pronto en el miotoma de los embriones y algunos autores lo han considerado el mejor marcador para diagnosticar los rabdomiosarcomas poco diferenciados<sup>143-45</sup>.

Durante la embriogénesis del músculo estriado, los filamentos de desmina serían responsables del ensamblaje ordenado de los miofilamentos, para formar sarcomeras. Si se sigue con anticuerpos antidesmina el desarrollo embrionario del músculo estriado, se aprecian filamentos de Desmina repartidos irregularmente en el mioblasto. Con el desarrollo, la Desmina va adquiriendo progresivamente la disposición descrita en el músculo adulto.

Aunque la bibliografía antigua sobre la Desmina ponía en duda su sensibilidad en cortes de tejido fijado en formol y desparafinado<sup>146</sup>, estudios más recientes han confirmado una sensibilidad excelente. En nuestras preparaciones puede diferenciar el mesénquima con diferenciación miogénica en embriones a partir de la cuarta semana cuando tiene un tamaño de poco más de un centímetro. En este periodo la positividad es escasa y limitada a ciertos agregados celulares con poca diferenciación.

La Desmina es positiva para un grupo de células redondas y fusiformes dentro del mesenquima poco diferenciado de la extremidad en las que el único dato

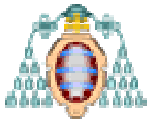


histológico diferenciable es el centro precondral cercano a ellas. A medida que avanza la miogénesis, los mioblastos se tiñen más intensamente, primero de forma difusa y luego adquiriendo las estriaciones típicas de los miocitos, lo que confirma su localización en las bandas Z del sarcómero. Las estriaciones típicas de la fibra muscular las observamos en el feto de 18 cm. A partir de ese momento el mesénquima está bastante diferenciado, con características histológicas muy similares a las del tejido adulto y el crecimiento es por aumento de tamaño, con poca maduración restante.

La Desmina es un marcador específico de célula muscular estriada y, en periodos avanzados de diferenciación, separa claramente el tejido muscular del tejido conectivo que lo rodea, siendo el primero positivo y el segundo negativo. También resulta negativa la dermis y los anejos cutáneos presentes en las preparaciones de fetos de 18 cm. Cabe resaltar en este estudio la negatividad de la pared vascular para la Desmina en nuestras preparaciones, siendo ésta positiva para la Actina ML y, en algún caso, para la Vimentina.

Como hemos citado anteriormente, la Desmina está presente en el citoesqueleto de la CML y, por lo tanto, debería ser, en principio, positiva. La negatividad se mantiene en el tiempo, incluso en periodos tardíos del desarrollo fetal, y la pared vascular continúa sin marcar a pesar del desarrollo de su capa muscular. Todo ello habla en contra de la desmina como marcador de músculo liso vascular, por lo menos durante el periodo fetal. Al respecto, apoyando estas observaciones, Gabbiani<sup>137</sup> afirma que la CML vascular difiere de la CML parenquimatosa en que esta última es rica en desmina y la primera es rica en Vimentina y  $\alpha$ -Actina. Durante la miogénesis se produce un aumento de expresión de desmina tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco. De modo parecido, este aumento de expresión también se produce en la capa muscular lisa del tracto intestinal y urogenital de gallina<sup>147-48</sup> y mamíferos<sup>149</sup>.

La presencia de la Desmina en la musculatura lisa vascular parece ser más escasa e irregular y todavía no está claro en qué momento de la miogénesis se produce su expresión, si bien parece ser de forma tardía<sup>148</sup>. Johansson estudia



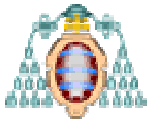
la expresión de la Vimentina y Desmina en la CML de distintas arterias y concluye que la Vimentina está ampliamente distribuida en la CML vascular, mientras que la distribución de la Desmina y la Citoqueratina varía. Cada arteria estudiada tiene un patrón de filamentos intermedios típico de su localización anatómica<sup>150</sup>.

En conjunto, los estudios nos indican que la Desmina no es, evidentemente, un marcador específico del linaje CML vascular, pero que puede resultar útil para evaluar el estado relativo de maduración/diferenciación de CML en ciertos vasos sanguíneos, si bien no en todos.

Como resumen, el anticuerpo anti-Desmina es un marcador diferencial de la fibra muscular estriada que aparece precozmente y aumenta con la maduración. Sin embargo, no marca la CML vascular durante la embriogénesis.

La MyoD1 forma parte de la familia de proteínas reguladoras nucleares miogénicas. Se une a genes que codifican factores de transcripción, cuya introducción en las células no musculares en cultivo puede iniciar la expresión de genes específicos del músculo e inducir la diferenciación muscular<sup>151-52</sup>. Además, estos factores reguladores se expresan mucho más pronto dentro del programa de diferenciación normal del músculo esquelético que algunas proteínas estructurales, como la Desmina, Actina y Miosina<sup>153</sup>.

Cuando comenzamos nuestro trabajo no utilizamos el marcador Myo D1 y en la mayoría de nuestras muestras no lo hemos podido utilizar puesto que el tejido se había agotado. No obstante, en los fetos recientes, hemos podido testar este anticuerpo y visto que en el feto de 1,5 cm era positiva en núcleos de alguna célula suelta redonda con una distribución parecida a la desmina. Comparando las imágenes de cortes de un embrión de 1,5 cm utilizando la MyoD1 y, después, la Desmina, observamos que los patrones de tinción se parecen. Ambas se expresan en regiones del mesénquima próximas a los centros precondrales. La diferencia entre la imagen con MyoD1 respecto a la Desmina es que la proporción de células que expresan MyoD1 es escasamente



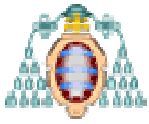
mayor al de células que expresan Desmina, si bien la Desmina se expresa de forma más intensa que la MyoD1.

Como comentamos anteriormente, la myoD1 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de los reguladores de la miogénesis que induce la diferenciación en células precursoras por su habilidad de frenar la proliferación e inducir la activación de genes específicos de diferenciación celular. La MyoD1 juega un papel importante en el antagonismo entre proliferación y diferenciación celular. Actualmente se está estudiando cómo el déficit de este factor en la célula muscular indiferenciada puede explicar el origen del rhabdomyosarcoma, cuyas células carecen del control tanto de la proliferación, como de la expresión de factores de transcripción que induzcan su diferenciación celular<sup>154</sup>.

En fetos de 4 cm es positiva en núcleos sueltos y fibras neurales. Más adelante en el desarrollo continúa apreciándose positividad nuclear del mioblasto-miotubulo y la MyoD1 marca el nervio periférico.

A partir de la décima semana del desarrollo se pierde la positividad nuclear de la fibra, observándose positividad citoplasmática tenue. Solo se debe considerar la reactividad nuclear frente a la MyoD1 como evidencia de diferenciación muscular esquelética porque el epitopo que reconoce los anticuerpos más empleados frente a la MyoD1, 5.8A, incluye secuencias de aminoácidos con homología estrecha respecto del antígeno mayor de histocompatibilidad clase 1 y diversos factores de transcripción, lo que sugiere que la reactividad citoplasmática puede representar una reacción cruzada en lugar de una expresión real de la MyoD1<sup>155</sup>. En las siguientes preparaciones, en el feto mayor de 10 cm, la tinción resulta negativa, manteniéndose igual en periodos posteriores.

En resumen, el anticuerpo anti-MyoD1 es un marcador nuclear exclusivo del músculo esquelético en desarrollo y se negativiza en nuestras preparaciones a partir de la novena-décima semana de desarrollo en el feto de 10 cm. En



preparaciones tempranas también encontramos positividad para la fibra neural que posteriormente se pierde. En la revisión bibliográfica realizada no hemos encontrado justificación para esta positividad temprana de la fibra neural.

El anticuerpo frente a la  $\alpha$ -Actina del músculo liso (Actina ML) reacciona en tejidos normales con células de músculo liso y no reacciona en tejidos adultos con fibroblastos, miocardio y músculo estriado<sup>156-58</sup>. La  $\alpha$ -Actina forma parte integrante del citoesqueleto de las CML fetales como se demuestra en nuestras preparaciones. Ya dentro del mesemquima en fetos de cuatro semanas aparecen estructuras vasculares positivas para esta proteína. Desmoulière, en 1992, estudió la relación entre la variación de esta proteína en el citoesqueleto de las CML vasculares fetal con los cambios que se producían en la pared vascular en los procesos de aterogénesis. La  $\alpha$ -Actina disminuía en la CML vascular de la placa ateromatosa y podría ser un marcador de este proceso<sup>159</sup>.

A medida que avanza la diferenciación aumenta la positividad en torno a las estructuras vasculares. También observamos positividad citoplasmática periférica tenue en los miotúbulos de los embriones y fetos de 4 cm. Esta positividad se mantiene en preparaciones posteriores.

La acumulación de células de músculo liso juega un papel principal en procesos como la aterogénesis, la reestenosis postangioplastias y las vasculopatías asociadas a los trasplantes. Todo esto hace que merezca la pena el estudio de los procesos de migración y proliferación de las células del músculo liso para prevenir el fenómeno de la remodelación vascular oclusiva y el papel que la  $\alpha$ -Actina juega en este proceso<sup>160</sup>.

En resumen, la  $\alpha$ -Actina que hemos utilizado es un marcador precoz de la CML vascular y en periodos tempranos de diferenciación tiñe de forma tenue el contorno del miotúbulo.

El CD31 se expresa en todos los endotelios continuos, incluso en los de las arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares no sinusoidales. Hoy en día se le

reconoce como un marcador diferenciador de las células de sangre periférica con alta capacidad angiogénica y vasculogénica. La molécula también juega un importante papel en otros procesos dentro de la función plaquetaria, la trombosis y diversos pasos dentro del proceso de la migración del leucocito a través de la pared de las venas<sup>161</sup>.

El estudio de las células madre tiene el potencial de proveer soluciones a muchas enfermedades crónicas a través de la terapia regenerativa. En la biología vascular, las células precursoras endoteliales (CPE) han sido identificadas como participantes en la angiogénesis y de esta forma se les atribuye potencial terapéutico para revascularizar tejidos isquémicos. Por lo tanto, su aislamiento podría ser de utilidad en el tratamiento de la enfermedad isquémica cardiovascular<sup>162</sup>. Aquí nosotros demostramos como el CD31 se expresa en las CPE pudiendo ser de utilidad como marcador diferenciador de estas células para su aislamiento con fines terapéuticos.

En nuestro trabajo, durante el periodo de indiferenciación la mayoría de las células fueron CD31 negativas. Observamos positividad aislada en las CPE y en algunas células aisladas fusiformes, lo que podría corroborar la relación de este antígeno de membrana con la angiogénesis<sup>163</sup>. Con la diferenciación temprana se mantuvo la positividad en las células endoteliales, siendo ésta bastante específica y no captando en el resto del mesénquima. En las muestras más maduras, la positividad perivascular se atenuó. Finalmente, como hallazgo destacable, en nuestra última muestra el anticuerpo anti-CD31 marcó de forma difusa el cartílago y mantuvo la positividad perivascular, aunque atenuada. A lo largo de las etapas de desarrollo el anticuerpo mostró una alta especificidad para el endotelio vascular y, exceptuando una imagen en donde el CD31 coloreó el cartílago, en el resto de la preparaciones fue un marcador exclusivo del endotelio, diferenciando claramente el contorno vascular<sup>164</sup>.

El marcador CD34 es el que más varía a lo largo de la morfogénesis. Está presente desde el primer momento como marcador del endotelio vascular, siendo exclusivo de estas células y negativo en el resto del mesénquima. La

función del CD34, una glucoproteína transmembrana, es todavía desconocida, si bien es un marcador sensible de las células madre hematopoyéticas<sup>165</sup>. En el feto de 5 semanas el patrón de tinción del CD34 resulta muy similar al obtenido con el CD31, lo que apoya su utilización como marcador diferenciador de los precursores endoteliales<sup>163</sup> y con negatividad para el resto del mesenquima<sup>166-167</sup>. En el embrión de 4 cm marca la pared vascular y el periostio.

Si bien el CD 34 actualmente está siendo utilizado como marcador diferenciador de determinados tumores fibrosos, como el dermatofibrosarcoma<sup>168-169</sup>, el tumor fibroso solitario<sup>170-171</sup> o el GIST<sup>172</sup>, poco se conoce de su expresión por el tejido conectivo normal durante la embriogénesis. Existen estudios respecto a la expresión del CD34 por células precursoras de fibroblastos de la médula ósea adulta<sup>173</sup> en pacientes con artritis reumatoide, pudiendo ser este antígeno un marcador precoz de maduración del mesénquima indiferenciado en tejido conectivo inmaduro.

Hirohata, en 2001, relacionó las células mesenquimales CD34(+) de la médula ósea del adulto en pacientes con Artritis Reumatoide (AR) con sinoviocitos tipo B responsables de la patogénesis en la AR. Sus resultados sugirieron que dichas células tendrían una respuesta anormal a diversos factores de diferenciación celular transformándose en sinoviocitos responsables de parte de la patogénesis en la AR<sup>173</sup>. El mismo autor, en 2005, examinó la capacidad de las células CD34(+) mesenquimales de pacientes con AR para diferenciarse en células endoteliales en orden de establecer el papel de la médula ósea en la neovascularización de la sinovial en la AR<sup>174</sup>.

Cuando el mesénquima está muy indiferenciado, las únicas células que expresan este antígeno son las endoteliales. En esta etapa todavía no existe un tejido conectivo como tal que sirva de sostén a otros más especializados, si bien a medida que avanza la gestación el anticuerpo delimita el tejido fibroso del periostio, fascias, etc. El músculo, cartílago y nervio fueron CD34 negativos a lo largo de la embriogénesis.





Como conclusión definimos al CD34 como un marcador precoz de pared vascular y precursores hematopoyéticos para, posteriormente, ser el anticuerpo que mejor delimita el tejido conectivo embrionario, pareciendo interesante estudiar su papel como marcador de las células madre mesenquimales y fibroblastos inmaduros.

Con respecto a la proteína S-100, inicialmente considerada específica de los tejidos de origen neuroectodérmico, en la actualidad se la reconoce formando parte del miocardio y musculo esquelético, melanocitos, condrocitos y anejos cutáneos, aparte de estar presente en neuronas, células de Schwann y glía<sup>175,176</sup>. Hemos encontrado publicaciones donde es utilizada como marcador específico del condrocito de la placa de crecimiento de la fisis del hueso en animales<sup>177</sup>. Sigimoto, por ejemplo, estudió la localización de la proteína en el cartílago articular de individuos de distintas edades y concluyó con que la S-100 estaba relacionada con la actividad metabólica de la matriz del cartílago y, en particular, con la del colágeno y los proteoglicanos. La proteína S-100, además, parece tener utilidad en la evaluación histológica de la actividad del proceso de reparación condral en los casos en los que este tejido se encuentra dañado<sup>178</sup>.

Para el diagnóstico inmunohistoquímico de las neoplasias de partes blandas, la máxima utilidad de la proteína S-100 es como marcador de tumores de la vaina nerviosa (benignos y malignos) y del melanoma<sup>179-180</sup>.

Durante el periodo de indiferenciación y el de diferenciación temprana, este anticuerpo, que presenta afinidad para la proteína S-100 humana, marca de forma tenue los condroblastos de los centros precondrales y diferencia de forma más intensa los precursores de los nervios periféricos. Esto apoya su utilización en IHQ como marcador de tumores derivados de las células de Schwann y neuronas junto con los tumores condrocíticos, como el condroblastoma, el condrosarcoma y el encondroma<sup>104</sup>. Esta positividad se mantiene en las preparaciones posteriores y con la maduración del tejido aumenta la expresión. De igual modo, también resultan positivos los nervios periféricos a lo largo de la diferenciación. En el feto de 28 semanas el

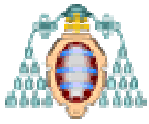
anticuerpo marca células aisladas intradérmicas correspondientes a melanocitos y células de Langerhans. Como hallazgo esperado encontramos la positividad de la S100 en lóbulos adiposos. Al respecto, en 2001, Atanassova estudió la expresión de la proteína S-100 en las células del tejido adiposo en el embrión humano, concluyendo que la proteína se expresaba de forma temprana en la lipogénesis y posiblemente actuaba como factor regulador de la formación de la grasa corporal y en la acumulación de lípidos por adipocitos<sup>181</sup>.

Todo ello nos confirma la utilidad del S-100 como marcador diferenciador de células precursoras de tejido neural y cartilaginoso en etapas tempranas del desarrollo, así como de tumores de partes blandas derivados de tejido neural y de la vaina nerviosa periférica, condral, adiposo y melanoma<sup>104,105,182</sup>.

Para el estudio del tejido nervioso hemos estudiado como marcadores diferenciadores los anticuerpos frente a la Sinaptofisina y frente a los NFP. La Sinaptofisina es una glicoproteína de membrana y componente de las vesículas sinápticas del terminal nervioso presentes en la mayoría de las neuronas y consideradas como orgánulos específicos de las neuronas sin equivalente en células no neuronales<sup>103</sup>. Salvo el tejido nervioso, neuroendocrino y la glándula suprarrenal, el resto de los tejidos resultan negativos para este anticuerpo<sup>108,111</sup>.

Los neurofilamentos constituyen un componente principal del citoesqueleto de la neurona y son los responsables del mantenimiento del calibre de los axones. La acumulación de los neurofilamentos está presente en múltiples enfermedades neurológicas y sus mutaciones se han visto relacionadas actualmente con la enfermedad de Parkinson, la Esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth<sup>183</sup>.

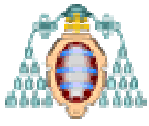
Ambos marcadores (Sinaptofisina y NFP) se expresan en los precursores neurales en el embrión de poco más de 1 cm, diferenciándolos como estructuras tubulares alargadas rodeadas de mesenquima negativo. Con la



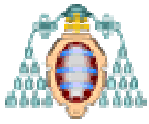
maduración siguen positivos, con marcada especificidad para los nervios, siendo negativos el resto de los tejidos derivados del mesénquima. En los haces nerviosos se sitúan sobre los axones neuronales en forma granular.

Como hemos visto a lo largo de esta discusión, el estudio de los marcadores antigénicos de las células mesenquimales podría ser de ayuda para entender la patogenia de innumerables procesos. Desde enfermedades autoinmunes como la AR y neurodegenerativas como el Parkinson hasta enfermedades isquémicas cardiovasculares y muchos tumores.

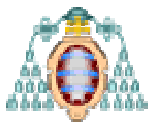
La IHQ aplicada al mesénquima fetal es una parte de la embriología muy poco desarrollada. Este trabajo abarca de forma general y básica un área de investigación de la cual estoy seguro que surgirán grandes descubrimientos en el futuro.



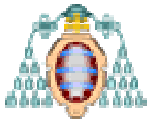
## **VI. CONCLUSIONES**



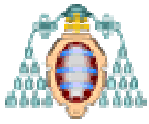
1. La inmunohistoquímica aplicada al mesénquima embrionario diferencia estirpes celulares que por su morfología serían indistinguibles y demuestra que aquél posee células con rasgos fenotípicos propios de los tejidos adultos desde el inicio del desarrollo de la extremidad.
2. Atendiendo a los cambios histológicos que ocurren durante la embriogénesis, aunque solapados, pueden distinguirse cuatro periodos de maduración tisular que podrían denominarse: de indiferenciación, de diferenciación temprana, de diferenciación intermedia y de diferenciación tardía.
3. Todos los marcadores aquí utilizados están presentes en el primer periodo del desarrollo, con una extremidad formada por mesénquima indiferenciado rodeado de una sola capa de epitelio. Dependiendo del marcador, su expresión disminuye o aumenta a medida que ocurre la diferenciación de los distintos tejidos derivados del mesénquima.
4. La compartimentalización de la embriogénesis en periodos a partir de estudios histológicos e inmunohistoquímicos, aunque aquélla sea un proceso continuo y éstos se solapen, ayuda a comprender mejor el proceso de diferenciación tisular en las extremidades y, profundizada, podría servir para facilitar el estudio de otras patologías, como la oncológica, la isquémica o la neurodegenerativa.



## VII. BIBLIOGRAFÍA



1. Kimber SJ, Sneddon SF, Bloor DJ, El-Bareg AM, Hawkhead JA, Metcalfe AD, Houghton FD, Leese HJ, Rotherford A, Lieberman BA, Brison DR. Expression of genes involved in early cell fate decisions in human embryos and their regulation by growth factors. *Reproduction* 2008; 135(5):635-47.
2. Vogel A, Rodríguez C, Warnken W, Izpisua Belmonte J. Dorsal cell fate specified by Chick Lmx-1 during vertebrae limb development. *Nature* 1995; 378(6568):716-20.
3. Kardon G. Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 1998; 125(20):4019-32.
4. Pittenger Mf, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-7.
5. Thomson JA, Litskovitz-Edor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391):1145-7.
6. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819):154-6.
7. Moore KE, Mills JF, Thornton MM. Alternative sources of adult stem cells: a possible solution to the embryonic stem cell debate. *Genet Med* 2006; 3(3):61-8.
8. Quesenberry PJ, Abedi M, Aliotta J, Colvin G, Demers D, Dooner M, Greer D, Hebert H, Menon M, Pimentel J, Paggioli D. Stem cell plasticity: an overview. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32(2):1-4.
9. A, Burton N, Bennet M, Baldock R, Davidson D, Mohun TJ, Logan MP. The Mouse Limb Anatomy Atlas: An interactive 3D tool for studying embryonic limb patterning. *Development Biology* 2008; 8:83.
10. Acloque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the Epithelial-Mesenchymal Transition. *EMBO reports* 2008; 9(4):322-6.
11. Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Review* 2005; 1(2):169-78.
12. Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 2007; 21(5):860-7.

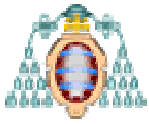


13. Alioua Z, Lamsyah H, Sbai M, Rimani M, Baba N, Ghfir M, Sedrati O. Pseudo-Kaposi's sarcoma secondary to superficial arteriovenous malformation. Steward-Bluefarb syndrome. *Ann Dermatol Venereol* 2008; 135(1):44-7.
14. Tariel D, Body G, Fetissof F, Menard F, Lansac J. Postoperative vaginal pseudosarcoma. Apropos of a case. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1986; 15(6):769-71.
15. Wills RA. The borderland of embryology and pathology. *Bull N Y Acad Med* 1950; 26(7): 440-60.
16. Randall JC, Morris DC, Tomita T, Anderson CC. Heterotopic ossification; a case report and immunochemical observations. *Hum Pathol* 1989; 20(1):86-8.
17. Apostolidis NS, Legakis NC, Gregoridis GC, Androulakis PA, Romanis AN. Heterophopic bone formation in abdominal operation scars. Report of six cases with review of the literature. *Am J Surg* 1981; 142(5):555-9.
18. Takashy K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4):652-5.
19. Okita k, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline component induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151):313-7.
20. Kleiss E. On the current status of embryology and teratology in the scope of physical sciences and medicine. *Wien Tierarztl Monastsschr* 1996;53(6):371-8.
21. Hahdu SI, Shiu MH, Brennan MF. The role of the pathologist in the management of soft tissue sarcomas. *World J. Surg* 1998; 12(3):326-31.
22. Kanegae Y, Tavares AT, Izpsua Belmonte JC, Verma IM. Role of Rel/Kappa B transcription factors during the growth of the vertebrae limb. *Nature* 1998; 392(6676):611-4.
23. Mahmood R, Dresnick J, Hornbruch A, Mahony C, Moston N, Colgohoun K, Martin P, Junsden A, Dickson C, Mason I. A role for FGF-8 in the initiation and manteinance of vertebrae limb outgrowth. *Curr Biol* 1995; 5(7): 797-806.
24. Okazaki K, Holtzer H. Myogenesis. Fusion, myosin synthesis and the myotic cicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966; 56(5):1484-90.
25. Yaffe D. Developmental changes preceding cell fusion during muscle differenciation in vitro. *Exp Cell Res* 1971; 66(1):33-48.

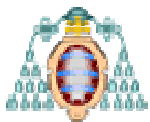




26. Heffner R. Histology for pathologists. 2ed. Philadelphia: Stephen Stermberg Lippincott Raven Publishers; 1997.
27. Langman J. Embriología médica. 3ed. Baltimor: The Williams and Williams Company; 1975.
28. Ishikawa H, Bischoff R, Holtzer H. Mitosis and intermediate-size filament in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* 1968; 38(3):538-55.
29. Hall SM, Hislop AA, Pierce CM, Haworth SG. Prenatal origins of human pulmonary arteries: formation and smooth muscle maturation. *Am J Respir Cell Biol* 2000; 23(2):194-203.
30. Han J, Lee JE, Jin J, Lim JS, Oh N, Kim K, Chang SI, Shibuya M, Kim H, Koh GY. The spatiotemporal development of adipose tissue. *Development* 2011;138(22):5027-37.
31. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsentein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Naqy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380(6573):435-9.
32. Eichmann A, Corbel C, Naiaf V, Vaigot P, Breant C, Le Douarin NM. Ligand-dependent development of the endothelial hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(10):5141-6.
33. Bjorntorp P, Hansson GK, Jonasson L, Pettersson P, Sypniewska G. Development of adipose tissue. *J. Lipid Res* 1983; 24(2):105-12.
34. Poissonet CM, Burdi AR, Bookstein FL. Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum Dev* 1983; 8(1):11.
35. Lallier LT. Cell lineage and cell migration in the neural crest. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 615:158-71.
36. Le Dourain NM, Dupin E. Cell lineage analysis in neural crest ontogeny. *J Neurobiol* 1993; 24(2):146-61.
37. Lobsiger CS, Taylor V, Sueter U. The early life of a Schwann cell. *Biol Chem* 2002; 382(2):245-53.
38. Lafevre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birt Defects Res C Embryo Today* 2005; 75(3):200-12.
39. Caplan A. Embryonic development and the principles of tissue engineering. *En. Tissue Engineering of cartilage and Bone* (Novartis Foundation Symposium 249) Chimester: Wiley 2003; 17-33.



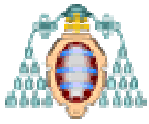
40. Moure KL. The Developing Human, 2nd ed. Philadelphia: PA Saunders; 1997. p.70-3.
41. Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol* 2009; 22:10-29.
42. Oryan A, Shoushtari AH: Histology and ultrastructure of the developing superficial digital flexor tendon in rabbits. *Anat Histol Embryol* 2008; 37(2):134-8.
43. Coons AH. The beginning of immunofluorescence. *J Immunol.* 1961; 87:499-503.
44. Coons AH. Immunofluorescence. *Public Health Rep* 1960;75:937-43.
45. Nekane P, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies. Preparation and application for the localization of antigen. *J Histochem Cytochem* 1966; 14(12):929-31.
46. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18(5): 315-33.
47. Taylor CR. Immunoperoxidase techniques. Theoretical and practical aspects. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102(3):113-21.
48. Hsu SM, Ree HJ. Self sandwich method: An improved immunoperoxidase technic for the detection of small amount of antigen. *Am J Clin Pathol* 1980; 74(1):32-9.
49. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29(4):577-80.
50. Vosse BA, Seelentag W, Bachmann A, Bosman FT, Yan P. Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the Avidin-Biotin Complex system and the EnVision+ system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15(1):103-7.
51. Huang SN, Minassian H, Moore JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin section improved by trypsin digestion. *Lab Invest.* *Lab Invest* 1976; 35(4):353-80.



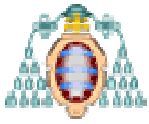
52. Jacobsen M, Clausen PP, Smidth S. The effect of fixation and trypsinization to the immunohistochemical demonstration of intracellular immunoglobulin in paraffin embedded material. *Acta Path Microbiol Scand A* 1980; 88(6):369-76.
53. Shi SR, Key ME, Kaira KL. Antigen retrieval in formalin fixed paraffin embedded tissues, and enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39(6):741-8.
54. Grown A, De Weuwe N, Battifora H. Microwave based antigenic unmasking: Revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem* 1993 ;1:256-66.
55. Imam SA, Yonug L, Chaiwun B, Taylor CR. Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed for immunostaining. *Anticancer Res* 1995; 15(4):1153-8.
56. Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabbatini E, Ascani S, Sanitini D, Piccaluga P, Leone O, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L, Falini B. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: Comparison of different methods. *J Pathol* 1997; 183(1):116-23.
57. Shi SR, Cote RJ, Yang C, Chen C, Xu HJ, Benedict WF, Taylor CR. Development of an optimal protocol for antigen retrieval: A "test battery" approach exemplified with reference to the staining of retinoblastoma protein (pRB) in formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1996; 179(3):347-52.
58. Salvadó M, Martínez S, Álvaro N, Barberá m, Risa R, Suñé A, Tomás B, Bosch R. Técnicas de desenmascaramiento antigénico en inmunohistoquímica. Estudio dirigido a anticuerpos con especiales dificultades en inmunodetección. *Rev Anat Patol* 2001; 34:255-60.
59. Leong AS. Pitfalls in diagnostic immunohistologic. *Adv Anat Pathol* 2004; 11(2):86-93.
60. Wick MR, Mills SE. Consensus interpretive guidelines for diagnostic immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(9):1208-10.
61. Diego L, Jorge B, Cesar LT, Carlos OH. Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Patología* 2007; 45:126-40.
62. Sadler TW, Langman. *Embriología Médica con orientación clínica*. 9ª ed. Madrid:Editorial Médica Panamericana; 2004.
63. Larsen W. *Embriología Humana*. 3 ed. Madrid: Elsevier; 2003.



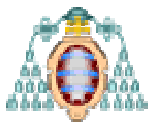
64. Raya A, Kawakami Y, Rodríguez-Esteban C, Ibañes M, Rasskin-Gutman D, Rodríguez-León J, Buscher D, Feijó JA, Izpisúa Belmonte JC. Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination. *Nature* 2004; 427(6970):121-8.
65. Rojas-Muñoz A, Bernad Miana A, y Izpisua Belmonte JC. El pez cebra: la navaja suiza de la biología. *Investigación y Ciencia* 2007; 366:62-9.
66. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II y Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Scienc* 2007; 318(5858):1917-20.
67. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K y Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5):861-72.
68. Del Valle M, Maestro A, García-Suárez O, Rodríguez L, Medina B, Vega J. Distribución de los receptores para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR<sub>α</sub> y PDGFR<sub>β</sub>) en el sistema músculo-esquelético. *Patología del Aparato Locomotor* 2006; 4:3-11.
69. Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, Partridge T. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 2005; 309(5743):2064-7.
70. Brennan MF, Casper E, Harrison L. Soft tissue sarcoma. In: De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg, ed: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5 ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers; 1997.p. 1738-88.
71. Julia C, Samuel N, Marta Y, Raúl Y, Maite L, Pilar M, Antonio L. Valor de la inmunohistoquímica en la tipificación de los sarcomas de partes blandas y su discordancia con el análisis histopatológico convencional: un estudio de casos procedentes del INO (Cuba). *Rev Esp Patol* 2005; 38(3):149-156.
72. Muro\_Cacho CA. The role of immunohistochemistry in the differential diagnosis of soft-tissue tumors. *Cancer Control* 1998; 5(1): 53-63.
73. Engallau J. Prognostic factors in soft tissue sarcoma. Tissue microarray for immunostaining, the importance of whole-tumor sections and time-dependence. *Acta Orthop Scand* 2004;75(314): 2-52.
74. Wu, C, Utomo V, Nadesan P, Whatstone H, Kandal R, Wunder JS, Almar BA. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Res* 2007; 67(17): 8216-22.



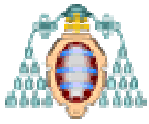
75. O'Rahilly R, Muller F: Development stages in Human Embryos. Washington, DC, Carnegie Institution of Washington, 1987.
76. LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.
77. Game SM, Stone A, Matthews JB, Prime SS. Differentiation of malignant oral rat keratinocytes reflects changes in EGF and TGF-receptor expression but not growth factor dependence. *Carcinogenesis* 1991; 12(3):409-16.
78. Uusitalo M, Kivela T, Tarkkanen A. Identification of a novel element in the human eye: The inner connective tissue layer of the ciliary body characterized with antibody to the HNK-1 epitope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34(7):2372-81.
79. Azumi N, Battifora H. The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors. *Am J Clin Pathol* 1987; 88(3):286-96.
80. Miettinen M, Lehto VP, Virtanen I. Antibodies to intermediate filament proteins in the diagnosis and classification of human tumors. *Ultrastruct Pathol* 1984; 7(2-3):83-107.
81. Chang TK, Li CY, Smithson WA. Immunocytochemical study of small round cell tumors in routinely processed specimens. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113(12):1343-8.
82. Van Muijen GN, Ruitter DJ, Warnaar SO. Coexpression of intermediate filament polypeptides in human fetal and adult tissues. *Lab Invest* 1987; 57(4):359-69.
83. Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(14):5434-8.
84. Dias P, Dilling M, Houghton P. The molecular basis of skeletal muscle differentiation. *Seminars in Diagnostic Pathology* 1994; 11(1):3-14.
85. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51(6):967-1000.
86. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Lackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, Zhuang Y, Lassar A. The MyoD gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 1991; 251(4995):761-6.



87. Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, Weintraub H. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 1990; 60(5):733-46.
88. Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PR, Weintraub H, Lassar AB. MyoD1: A nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 1988; 242(4877):405-11.
89. Wang NP, Marx J, McNutt MA, Rutledge JC, Gown AM. Expression of myogenic regulatory proteins (myogenin and MyoD1) in small blue round cell tumors of childhood. *Amer J Path* 1995; 147(6):1799-810.
90. Skalli O, Schürch W, Seemayer T, Lagacé R, Montandon D, Pittet B, Gabbiani G. Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 1989; 60(2):275-85.
91. Skalli O, Pelte M-F, Pecllet M-C, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L.  $\alpha$ -smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem* 1989; 37(3):315-2.
92. Rønnev-Jessen L, Van Deurs B, Celis JE, Petersen OW. Smooth muscle differentiation in cultured human breast gland stromal cells. *Lab Invest* 1990; 63(4):532-43.
93. Schmitt-Gräff A, Krüger S, Bochar F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Amer J Pathol* 1991; 138(5):1233-42.
94. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990; 43(9):752-7.
95. DeYoung BR, Swanson PE, Argenyi ZB, Ritter JH, Fitzgibbon JF, Stahl DJ, Hoover W, Wick MR. CD31 immunoreactivity in mesenchymal neoplasms of the skin and subcutis: Report of 145 cases and review of putative immunohistologic markers of endothelial differentiation. *J Cutan Pathol* 1995; 22(3):215-22.
96. Engel CJ, Bennett ST, Chambers AF, Doig GS, Kerkvliet N, O'Malley FP. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Dukes staging. *Am J Surg Pathol* 1996; 20(10):1260-5.
97. Fox SB, Leek RD, Bliss J, Mansi JL, Gusterson B, Gatter KC, Harris AL. Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(14):1044-9.

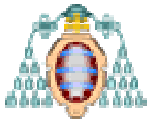


98. Giatromanolaki A, Koukourakis M, O'Byrne K, Fox S, Whitehouse R, Talbot DC, Harris AL, Gatner KC. Prognostic value of angiogenesis in operable non-small cell lung cancer. *J Pathol* 1996; 179(1):80-8.
99. Molgaard HV, Spurr NK, Greaves MF. The hematopoietic stem cell antigen, CD34, is encoded by a gene located on chromosome 1. *Leukemia* 1989; 3(11):773-6.
100. Sauter B, Foedinger D, Sterniczky B, Wolff K, Rappersberger K. Immunoelectron microscopic characterization of human dermal lymphatic microvascular endothelial cells: Differential expression of CD31, CD34 and Type IV collagen with lymphatic endothelial cells vs blood capillary endothelial cells in normal human skin, lymphangioma and hemangioma in situ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46(2):165-76.
101. Batinic D, Tindle R, Boban D, Tiefenbach A, Rajic L, Labar B, Nemet D, Boranic M. Expression of haematopoietic progenitor cell associated antigen BI-3C5/CD34 in leukaemia. *Leukemia Res* 1989; 13(1):83-5.
102. Fletcher CDM. Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: Fact or fiction? *Amer J Surg Pathol* 1992; 16(3):213-28.
103. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol* 1988; 15(4):201-7.
104. Monda L, Wick MR. S-100 protein immunostaining in the differential diagnosis of chondroblastoma. *Hum Pathol* 1985; 16(3):287-93.
105. Kanitakis J, Fantini F, Pincelli C, Hermier C, Schmitt D, Thivolet J. Neuron-specific enolase is a marker of cutaneous Langerhan's cell histiocytosis "X". A comparative study with S100 protein. *Anticancer Res* 1991; 11(2):635-9.
106. Yang WI. Immunohistochemical study on antigenic phenotype of Langerhans cell histiocytosis. *Yonsei Med J* 1992; 33(4):309-19.
107. Wiedenmann B, Franke WW. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 1985;41(3):1017-28.
108. Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P. Protein p38: An integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol* 1986; 103(6 Pt 1):2511-27.
109. Chejfec G, Falkmer S, Grimelius L, Jacobsson B, Rodensjö M, Wiedenmann B, Franke WW, Lee I, Gould VE. Synaptophysin. A new



- marker for pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol* 1987; 11(4):241-7.
110. Stefaneanu L, Ryan N, Kovacs K. Immunocytochemical localization of synaptophysin in human hypophyses and pituitary adenomas. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112(8):801-4.
  111. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE. Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(10):3500-4.
  112. Gould VE, Wiedenmann B, Lee I, Schwechheimer K, Dockhorn-Dworniczak B, Radosevich JA, Moll RR, Franke WW. Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunocytochemistry. *Am J Pathol* 1987; 126(2):243-57.
  113. Schlaepfer WW. Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987; 46(2):117-29.
  114. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and ytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(1):79-90.
  115. Diepholder HM, Schwechheimer K, Mohadjer M, Knoth R, Volk B. A clinicopathologic and immunomorphologic study of 13 cases of ganglioglioma. *Cancer* 1991; 68(10):2192-201.
  116. Luider TM, van Dommelen MW, Tibboel D, Meijers JH, Ten Kate FJ, Trojanowski JQ, Molenaar JC. Differences in phosphorylation state of neurofilament proteins in ganglionic and aganglionic bowel segments of children with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1992; 27(7): 815-9.
  117. Van Muijen GNP, Ruiter DJ, Warnaar SO. Intermediate filaments in Merkel cell tumors. *Hum Pathol* 1985; 16(6):590-5.
  118. Bruce M. Carlson. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 4 ed. Barcelona: Elsevier; 2009.
  119. Dahn RD, Fallon JF: Limiting outgrowth: BMPs as negative regulators in limb development. *BioEssays* 1999; 21(9):721-5.
  120. Hall B. *Bones and Cartilage: Developmental Skeletal Biology*. Philadelphia: Elsevier; 2005.
  121. Shinohara H, Naora H, Hashimoto R, Hatta T, Tanaka O. Developmente of innervation patterns in the upper limb of staged human embryos. *Acta Anat.* 1990; 138(3):265-9.
  122. Keith L, Moore T.V.N Persaud. *Embriología clínica*. 8 ed. Barcelona: Elsevier; 2008.

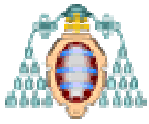




123. Weiss S.W, Goldblum J.R. Enzinger and Weiss's Soft tissue Tumors. 5 ed. Mosby Elsevier; 2008.
124. Fletcher CD. The evolving classification of soft tissue tumours: an update based on the new WHO classification. *Histopathology* 2006; 48(1):3-12.
125. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(12):895-902.
126. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859):105-11.
127. Wu C, Wei Q, Utomo V, Nadesan P, Whetstone H, Kandel R, Wunder R, Wunder JS, Alman BH. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Res* 2007; 67(17):8216-22.
128. Fletcher CD. Immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue sarcomas. *Recent Results Cancer Res* 1995; 138:17-24.
129. Muro-Cacho CA. The role of immunohistochemistry in the differential diagnosis of soft-tissue tumors. *Cancer Control* 1998; 5(1): 53-63.
130. Engallau J. Prognostic factors in soft tissue sarcoma. Tissue microarray for immunostaining, the importance of whole-tumor sections and time-dependence. *Acta Orthop Scand* 2004; 75 Supl 314: 2-52.
131. Osborn M, Casselitz J, Weber K. Heterogeneity of intermediate expression in vascular smooth muscle: a gradient in desmin positive cells from the rat aortic arch to the level of the arteria iliaca communis. *Differentiation* 1981; 20(3):196-202.
132. Dahl D. The Vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J Neurosci Res* 1981; 6(6):741.
133. Virtanen I, Lehto V, Lehtonen E, Vartio T, Stemman SP, Kurki P, Wager O, Small JV, Dahl D, Badley RA. Expression of intermediate filaments in culture cells. *J Cell Sci* 1981; 50:45.
134. Connell ND, Rheinwald JG. Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells: reversible loss of keratin and increase in vimentina during rapid growth in culture cells. *Cell* 1983; 34(1):245-53.
135. Battifora H. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry: The vimentina internal control. *Am J Clin Pathol* 1991; 96(5):669-76.
136. Kim HD. Expression of intermediate filament desmin and vimentin in the human fetal heart. *Anat Rec* 1996; 246(2):271-8.



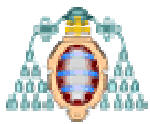
137. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Pkhashtonay C, Vandekerckhove J, Weber K, Franke WW. Vascular smooth muscle cells differs from other smooth muscle cells: Predominance of vimentina filaments and a specific  $\alpha$ -type actin. *Proc Natl Acad U S A* 1981; 78(1):298-302.
138. Li Zi, Lilienbaum A, Butter, Browne G, Paulin D. Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. *Gene* 1989;78(2); 243-54.
139. Kindblom L, Seidal T, Karlsson K. Immunohistochemical localization of myoglobin in human muscle tissue and embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand – Section A, Pathology* 1982; 90(3):167-74.
140. Andriko J, Kaldjian E, Tsokos M, Abbondazo GL, Jaffe SL. Reticulum cell neoplasms of lymph nodes: a clinicopathologic study of 11 cases with recognition of a new subtype derived from fibroblatis reticular cell. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(9):1048-58.
141. Cho J, Gong C, Choe G, Lee I. Extrafollicular reticulum cells in pathologic limph nodes. *J Korean Med Sci* 1994; 9(1):9-15.
142. Vam Muijen G, Ruitter DJ, Warnaar SO. Coexpression of intermediate filament polypeptides in human fetal and adult tissues. *Lab Invest* 1987; 57(4):359-69.
143. Franquemont DW, Friedson HF Jr, Mills SE. An inmunochemical study of normal endometrial stroma and endometrial stroma neoplasms. Evidence for smooth muscle diferenciacion. *Am J Surg Pathol* 1991; 15(9):861-70.
144. Altamannsberger M, Weber K, Droste R, Osborn M. Desmin is a specific marker for rhabdomyosarcomas of human and rat origin. *Am Pathol* 1985; 118(1):85-95.
145. Parham D, Webber B, Holt H, Willians WK, Maurer H. Immunohistochemical study of childhood rhabdomyosarcomas and related neoplasms. Results of an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Project. *Cancer* 1991; 67(12):3072-80.
146. Leader M, Collins M, Patel J, Henry K. Desmin: its value as a marker of muscle derived tumors using a commercial antybody. *Pathol Anat Histopathol* 1987; 411(4):345-9.



147. Bennett G, Fellini S, Croop J, Otto J, Bruan J, Holtzer H. Differences among 100-angstrom filament subunits from different cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(9):4364-8.
148. Schart G, Viebalin C, Langmann W, Ramackers F. Desmin and titin expression in early preimplantation mouse embryos. *Development* 1989; 107(3):585-96.
149. Franke W, Schmid E, Freudestein C. Intermediate side filaments of prekeratin type in myoepithelial cell. *J Cell Biol* 1986; 84:633-84.
150. Johansson B, Eriksson A, Virtanen I, Thornell LE. Intermediate filament proteins in adult human arteries. *Anat Rec* 1997; 247(4): 439-48.
151. Braun T, Bober E, Buschhausen-Denker G, Kohtz S, Grzeschik KH, Arnold HH. Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. *Embo* 1989; 8(12):3617-25.
152. Wei Q, Paterson BM. Regulation of MyoD function in the dividing myoblast. *FEBS Lett.* 2001; 490(3):171-8.
153. Kitzmann M, Fernandez A. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(4):571-9.
154. Tintignac LA, Leibovitch MP, Leibovitch SA. New insight into MyoD regulation: involvement in rhabdomyosarcoma pathway?. *Bull Cancer.* 2001 Jun; 88(6):545-8.
155. Peter Dias, David M. Parham, David N. Shapiro, Stephen J. Tapscott, and Peter J. Houghton<sup>2</sup> Monoclonal Antibodies to the Myogenic Regulatory Protein MyoD1: Epitope Mapping and Diagnostic Utility . *Cancer Res* 1992; 52(23):6431-9.
156. Lessard JL. Two monoclonal antibodies to actin: one muscle selective and one generally reactive. *Cell Motil Cytoskel* 1988; 10(3):349-62.
157. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzanana G, Gillesen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alfa-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986; 103(6 Pt 2):2787-96.
158. Skalli O, Gabbiani G, Babai F, Seemayer TA, Pizzolato G, Schurch W. Intermediate filament protein and actin isoform as marker for soft tissue tumor differentiation and origin. II. Rhabdomyosarcoma. *Am J Pathol* 1988; 130(3):515-31.
159. Desmoulière A, Gabbiani G. The cytoskeleton of arterial smooth muscle cells during human and experimental atheromatosis. *Kidney Int Suppl* 1992; 37:S87-9.



160. Roberts N, Jahangiri M, Xu Q. Progenitor cells in vascular disease. *J Cell Mol Med* 2005; 9 (3):583-91.
161. Abigail Woodfin, Mathieu-Benoit Voisin, Sussan Nourshargh. PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007; 27(12):2514-23.
162. Sung-Whan Kim P, Hyongbum Kim M, Hyun-Jai Cho M, Jung-Uek Lee M, Rebecca L, Young-sup Y. Human Peripheral Blood-Derived CD31(+) Cells Have Robust Angiogenic and Vasculogenic Properties and Are Effective for Treating Ischemic Vascular Disease. *J Am Coll Cardiol*, 2010; 56:593-607.
163. Delisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; 151(3):671-7.
164. Vecchi A, Garlanda C, Lampugnani MG, Resnati M, Matteucci C, Stoppacciaro A, Schnurch H, Risau W, Ruco L, Mantovani A, et al. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur. J. Cell Biol* 1994; 63(2):247-254.
165. Ito T, Tajima F, Ogawa M. Development changes of CD 34 Expression in murine hematologic stem cells. *Exp Hematol* 2000; 28(11): 1269-73.
166. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone Marrow Stromal Cells: Nature, biology, and potencial applications. *Stem Cells*. 2001; 19(3): 180-92.
167. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2006; 312(12):2169-79.
168. Aiba S, Tabata N, Ishii H, Ootani H, Tagami H. Dermatofibrosarcoma protuberans is a unique fibrohistiocytic tumour expressing CD34. *Br J Dermatol* 1992; 127(2): 79-84.
169. Billings SD, Folpe AL. Cutaneous and subcutaneous fibrohistiocytic tumors of intermediate malignancy. An update. *Am J Dermatopathol* 2004; 26(2):141-55.
170. Brozzetti S, D'Andrea N, Limiti MR, Pisanelli MC, De Angelis R, Cavallaro A. Clinical behavior of solitary fibrous tumor of the pleura. An immunohistochemical study. *Anticancer Res* 2000; 20(6c): 4701-6.
171. Yokoi T, Tsuzuki T, Yatabe Y, Suzuki M, Kurumaya H, Koshikawa T, Kuhara H, Kuroda M, Nakamura N, Nakatani Y, Kakudo K. Solitary



- fibrous tumor: significance of p53 and CD43 immunoreactivity in its malignant transformation. *Histopathology* 1998; 32(5): 423-432.
172. Kang YN, Jung HR, Hwang I. Clinicopathological and immunohistochemical features of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res Treat* 2010; 42(3):135-43.
  173. Hirohata S, Yanagida T, Nagai T, Sawada T, Nakamura H, Yoshino S, Tomita T, Ochi T. Induction of fibroblast-like cells from CD34 progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *J of Leukocyte Biology* 2001; 70:413-21.
  174. Hirohata s, Yanagida T, Nampei A, Kunugiza Y, Hashimoto M, Tomita T et al. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: possible role in synovial neovascularization. *Arthritis Rheum* 2004; 50(12):3888-96.
  175. Taylor C. *Immunimicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist*. Philadelphia: Saunders; 1986.
  176. Kahn H, Marks A, Thom H, Baumal R. Role of antibody to S-100 protein in diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol* 1983; 79(3):341-7.
  177. Helmrud I, Gautam M, Richard O, Oreffo M, Clarke C, Cyrus C. Temporal Analysis of Rat Growth Plates: Cessation of Growth with Age Despite Presence of a Physis. *J Histochem Cytochem* 2003; 51(3): 373.
  178. Sigimoto S, Kusuzaki K, Takashita H, Kuzuhare A, Tsuji Y, Yamashita F et al. The distribution of S-100 protein positive chondrocytes in the human articular cartilages under aging or disease condition. *Nihon Seikeigeka Gakka Zasshi* 1991; 65(10):902-8.
  179. Weiss SW, Langloss JM, Enzinger FM. Value of S-100 protein in the diagnosis of soft tissue tumors with particular reference to benign and malignant Schwann cell tumors. *Lab Invest* 1983; 43(3):299-308.
  180. Ana M. *La protein S-100 en tumores melanociticos de la piel (Tesis doctoral)*. Madrid. Universidad Complutense de Madrid; 1993.
  181. Atanassova P. Immunohistochemical expression of S-100 protein in human embryonal fat cells. *Cells Tissues Organs* 2001; 169(4):355-60.
  182. Okajima K, Honda I, Kitagawa T. Immunohistochemical distribution of S-100 protein in tumors and tumor-like lesions of bone and cartilage. *Cancer* 1988; 61(4):792-9.
  183. Al-ChalabiA, Miller CC. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays* 2003; 25(4):346-55.

