

# MICROSCOPIA FLUORESCENTE EN BLOQUES CELULARES\*

DR. HÉCTOR MÁRQUEZ M.\*\* DRA. PATRICIA ALONSO\*\*\*

La iniciación de la microscopía fluorescente con anaranjado de acridina en citología exfoliativa por Bertalaffny y colaboradores<sup>1,2</sup> se basa en la tinción selectiva del ácido ribonucleico de las células con gran actividad de síntesis proteica como lo son las células tumorales.

La coloración obtenida con la acridina anaranjada, es anaranjada a roja, en presencia de contenido alto de ácido ribonucleico y a un pH ácido.

Este método ha tenido amplia confirmación según lo demuestran los estudios de Dart y Turner<sup>3</sup>, Elvitch y Brunson<sup>4</sup>, Liu<sup>5</sup>, Márquez y Navarro<sup>7</sup>.

El uso del método de la microscopía fluorescente también ha sido utilizado ventajosamente por Braunstein y Adriano<sup>6</sup> para la tinción de bacilos ácido alcohol resistentes con auramina, en preparaciones de parafina; además se ha utilizado en estudios de inmunohistoquímica en secciones de tejidos frescos.

En el presente trabajo se aplica el método ya descrito a secciones de parafina, de colecciones celulares obtenidas de derrames de cavidades serosas, para valorar la utilidad en el diagnóstico de células neoplásicas.

## MATERIAL Y METODO

De los archivos de la Unidad de Patología del Hospital General se obtuvieron 14 casos de neoplasias malignas con metástasis a peritoneo y pleura, que se diagnosticaron por citología exfoliativa y mediante la concentración e inclusión celular en parafina para preparaciones histológicas. Estos bloques se elaboraron mezclando partes iguales del líquido problema y formol al 40%; el sedimento siguió su elaboración como tejido, incluyéndose en parafina. De esta manera se obtuvo mayor concentración en el número de células o bien la totalidad de las mismas. En todos los casos hubo confirmación histológica ulterior por medio del estudio de una biopsia o bien de la autopsia correspondiente.

A manera de controles, se tomaron 10 bloques celulares con diagnóstico citológico negativo, pero que

habían sido problemas en el diagnóstico rutinario con la tinción de Papanicolaou y la tinción de hematoxilina y eosina, por las atipias encontradas en las células mesoteliales y que contaban también con comprobación histológica posterior. Estos casos correspondieron a enfermos con cirrosis hepática u otros padecimientos que produjeron ascitis o derrames de naturaleza irritativa no tumoral y en los cuales había abundantes elementos celulares.

Para la determinación de contenido en ácido ribonucleico que permitiera una coloración apropiada se usaron como controles secciones de páncreas normal.

De los bloques celulares problema y de los controles se hicieron dos cortes en continuidad (5 micras) suponiendo que de esta manera se lograba una distribución homogénea en ambas secciones. Una de estas secciones fue teñida por el método de anaranjado de acridina, siguiendo las indicaciones de Dart y Turner<sup>3</sup>, con una modificación consistente en utilizar un pH de 4.5, en lugar de el de 3.8 preconizado por los autores mencionados y la segunda sección por hematoxilina y eosina. Además, después del estudio de fluorescencia las preparaciones fueron destañadas y se colorearon con hematoxilina y eosina para nuevo estudio.

Se utilizó un microscopio Reichert (Esquema 1), dotado de lámpara de vapor de mercurio de 200 w, y un filtro Jena BG 12 se interpuso entre la lámpara de vapor de mercurio y el microscopio para obtener longitudes de onda de 360 a 480 mμ, otro filtro tipo Jena OG 1 se interpuso entre el objetivo y los oculares para permitir el paso de longitudes de ondas superiores a 500 mμ y absorber las radiaciones de excitación que pasan por el filtro inicial después de pasar por el frotis, dando así un fondo oscuro y permitiendo el paso de la fluorescencia emitida por las células. Las microfotografías fueron tomadas con película Kodachrome F ASA 10 con exposiciones de 2 a 3 minutos.

## RESULTADOS

De los 14 casos estudiados 9 correspondieron a líquido de ascitis y 5 a líquidos de derrame pleural.

Los diagnósticos anatómicos fueron: dos casos de carcinoma primario de hígado, dos casos de adenocarcinoma metastásico en ovario, dos casos de seminoma, un caso de carcinoma testicular embriona-

\* Leído en el III Congreso Latinoamericano de Anatomía Patológica, Medellín, Colombia, Diciembre de 1961.

\*\* Unidad de Patología, Hospital General, México 7, D. F.

\*\*\* Citólogo del Instituto Nacional de Cancerología.

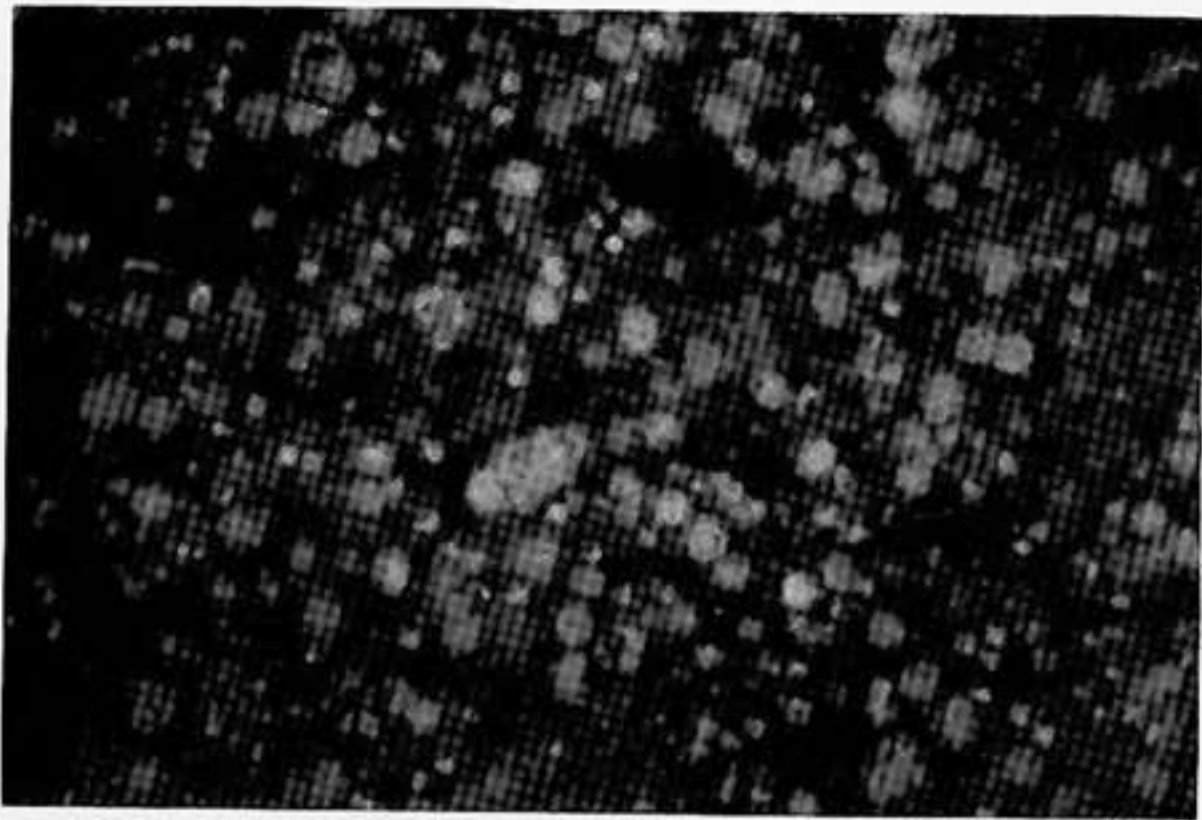


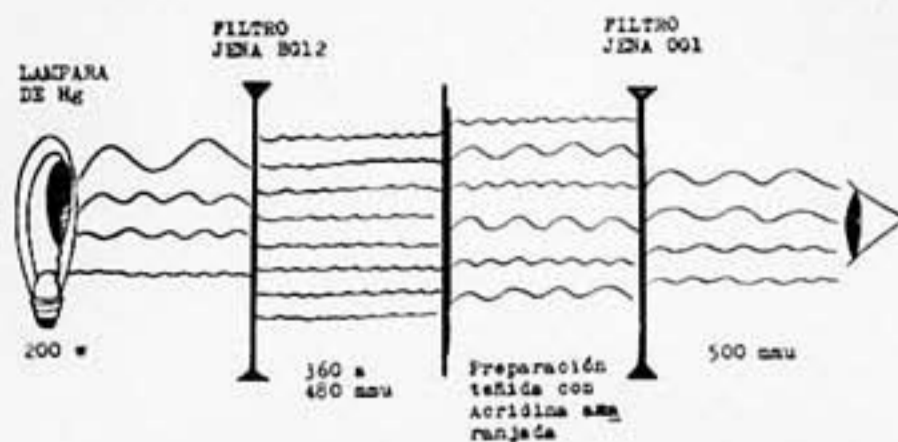
Fig. 1. Bloque celular de líquido pleural positivo. Se observan numerosos grupos de células con coloración amarilla del citoplasma.



Fig. 2. Bloque celular de líquido pleural positivo, además de la coloración en el nucleolo y en el halo perinuclear dado por el contenido en ácido ribonucleico, se puede observar la morfología celular.



Fig. 3. Bloque celular de líquido pleural negativo "bloque problema", en el que se observan las células teñidas no selectivamente como en los casos anteriores de color amarillento.



Esquema 1. Esquema del aparato usado.

rio, un caso de carcinoma de ovario, un caso de disgerminoma, un caso de cistadenocarcinoma papilar del ovario, dos casos de carcinoma gástrico, un caso de carcinoma mamario y un caso de carcinoma prostático.

Como se ha dicho, el diagnóstico se hizo inicialmente en frotis y bloques celulares teñidos por el método de Papanicolaou y hematoxilina y eosina respectivamente, en ellos la morfología de las células fue sugestiva de corresponder a elementos tumorales malignos, sin embargo, en este tipo de estudios con frecuencia se encuentran células mesoteliales con atipias marcadas que pueden dar confusión con células neoplásicas.

En la tinción de acridina anaranjada los elementos tumorales muestran una coloración rojiza o anaranjada del citoplasma, la cual está relacionada con la mayor actividad de síntesis proteica, por la elevada concentración de ácido ribonucleico y por la misma característica que presentan las células tumorales. Los elementos no tumorales toman una coloración verde clara en el citoplasma, además los detalles morfológicos fácilmente observables en las tinciones de rutina se suman a la coloración ya mencionada y hacen más fácil el diagnóstico.

Todas las células neoplásicas de los 14 casos es-

tudiados mostraron coloración rojiza anaranjada en el citoplasma y en el núcleo. Su observación fue rápida y se distinguieron con facilidad de las células mesoteliales atípicas del grupo control.

Este método se considera como un adelanto en el diagnóstico de los elementos tumorales, la simple morfología utilizada como índice de valor objetivo ocupa un segundo lugar ya que se utiliza la tinción selectiva de las células neoplásicas debida a su metabolismo proteico alterado. Es indudable que la histoquímica como método preciso es valioso y discrimina fácilmente las variantes morfológicas de las células normales.

(Fotos: 1, 2 y 3)

## CONCLUSIONES

El método de la microscopía fluorescente es un auxiliar valioso y de manejo simple en el diagnóstico de las células tumorales en líquidos de derrames serosos, en donde la simple morfología no da los datos suficientes para poder diferenciarlas de las células atípicas no tumorales.

Este método sencillo está al alcance de cualquier laboratorio que cuente con el equipo especial.

## BIBLIOGRAFIA

1. Von Bertalanffy, L., Masin, M.: Use of acridine orange fluorescence technique in exfoliative cytology. *Science* 124: 1024-1025, 1956.
2. Dart, L. H., y Turner, T. R.: Fluorescence microscopy in exfoliative cytology. *Lab. Invest.* 8: 1513-1522, 1956.
3. Von Bertalanffy, L., Masin, M. y Masin, F.: A new rapid method for diagnosis of vaginal and cervical cancer by the use of fluorescence microscopy. *Cancer* 11: 873-887, 1958.
4. Liu, W.: Fluorescence microscopy in exfoliative cytology. *Arch. Path.* 71: 282-285, 1960.
5. Braunstein, H. y Adriano, S. M.: Fluorescent stain for tubercule bacilli in histological sections. *Am. J. Clin. Path.* 36: 37-40, 1961.
6. Elevitch, F. R. y Brunson, J. G.: Rapid identification of malignant cells in vaginal smears by cytoplasm fluorescence. *Surg. Gynec. and Obs.* 112: 3-10, 1961.
7. Márquez, M. H. y Navarro, G.: Microscopía fluorescente en citología exfoliativa cérvico vaginal. *Rev. Med. Hosp. Gral.* 24: 237-240, 1961.