COLORACION EN DIEZ SEGUNDOS CON ACRIDINA-NARANJA POR EL METODO DE RIVA-TURNER

Doctores **Jorge E. Medina ***, **Thomas R. Turner ****,
William J. Jaffurs ***

Papanicolau en los Estados Unidos y Ruriel Babes en Rumania, hicieron las primeras publicaciones sobre el uso de la citología exfoliativa para el diagnóstico del cáncer, en el año de 1928 (10). En 1941 Papanicolau y Traut publicaron en el "Am. J. of Obst. and Gynec." la monografía titulada "El valor diagnóstico del frotis vaginal en carcinoma del útero" (6). Desde esta época la citología exfoliativa abrió nuevos horizontes investigativos y a medida que se fue comprobando su eficacia y exactitud, se fueron descubriendo nuevas aplicaciones tanto clínica como experimentales y se fue popularizando su empleo, hasta considerarse actualmente como procedimiento rutinario en la mayoría de las instituciones médicas de los países más adelantados del mundo.

Con la popularización de la citología, se ha aumentado considerablemente la demanda de personal capacitado para poder satisfacer adecuadamente las necesidades de muchos centros médicos

importantes y de muchos países donde aún no hay un número suficiente de personal entrenado. Con el objeto de vencer estas dificultades y colocar la citología al alcance del personal médico que está directamente en contacto con los pacientes, como son los obstetras y ginecólogos, Riva y Turner en el Laboratorio de Investigaciones Citológicas del Departamento de Obstetricia y Ginecología del Walter Reed General Hospital en Washington, D. C., perfeccionaron el uso de la Fluorescencia microscópica, la cual había sido empleada en frotis vaginales por primera vez en el año de 1950 por Freedman usando sulfato de barberina, fuscina ácida y acridina amarilla como fluorocromos y en 1956 por von Bertalanffy y su grupo (1) (2) quienes describieron un nuevo método usando acridina naranja a un pH de 6; con esta técnica el ARN (ácido ribonucleico) y el ADN (ácido dextrirribonucleico) se diferencian por el color. El método de Riva y Turner (7)

* Research Fellow, Columbia Hospital for Women.

** Catedrático de Citología, Seton Hall College of Medicine and Dentistry, Jersey City, New Jersey.

*** Jefe del Departamento de Patología, Columbia Hospital for Women.

(8) se basa en la morfología y fluorescencia nuclear debida al ADN que este contiene, sin tener en cuenta las propiedades del citoplasma, pudiéndose detectar así células malignas o sospechosas teniendo como criterio primordial el aumento de la fluorescencia nuclear.

Esta técnica es extremadamente sencilla. Para la toma del frotis se le advierte a la paciente la importancia de no hacerse duchas o aplicarse ninguna medicación local durante las 24 horas previas al examen. La presencia de sangre no es contraindicación porque la hemoglobina no se colorea. Con la paciente en posición ginecológica, se introduce un espéculo vaginal con mucha delicadeza sin usar ningún lubricante. Una vez que el cuello ha sido expuesto se toma la muestra utilizando un aplicador de algodón el cual se introduce primero en el canal endocervical haciendo movimiento rotatorio; en seguida se rota sobre la superficie externa del cuello, alrededor del orificio externo e inmediatamente se hace la extensión en un portaobjetos utilizando la mitad de éste; un segundo frotis se toma de las paredes vaginales en el fondo de saco de Douglas, usando otro aplicador de algodón, el cual se extiende en la otra mitad del portaobjetos. En pacientes de más de 40 años, o cuando se sospecha patología por encima del nivel del cuello (endometrio, trompas u ovarios) se recomienda hacer una aspiración endometrial usando un tubo de polietileno o una cánula metálica delgada (Se han diseñado varios modelos para este fin).

Si el frotis ha sido adecuadamente tomado con aplicador de algodón y rotado a lo largo del portaobjetos, es nece-

sario fijarlo y subsecuentemente rehidratarlo.

Para colorearlo sólo se requiere 10 segundos: Se introduce y agita fuertemente durante tres segundos en una solución al 0.025% de acridina-naranja, luego se repite la misma maniobra en una solución al 2% de etil-alcohol en solución salina y finalmente se pasa por cuatro segundos en solución salina normal. La agitación vigorosa en todas las soluciones produce los mejores resultados. Antes de examinar el frotis al microscopio se monta el cubreobjetos sobre una gota de solución salina.

Si se desea, los frotis pueden ser decolorados en una solución al 50% de alcohol y coloreados de nuevo por el método deseado.

Equipo. Un microscopio corriente binocular con objetivos 10x y 40x, una lámpara de vapor de mercurio, como la diseñada especialmente por Nikon para este método (su costo aproximado es de US\$ 150.00) o cualquier lámpara de vapor de mercurio con filtros BG 12 de 8 mm de espesor para uso corriente o de 4 mm de espesor para microfotografía. En cada ocular del microscopio se coloca un filtro Kodak Wratten G (15G) con el objeto de absorber la luz.

Este método puede ser aplicado como procedimiento de consultorio por individuos que hayan sido entrenados durante pocas semanas, para:

A) *Diagnóstico de alteraciones endocrinas*

La actividad de los ovarios se refleja en el epitelio vaginal. Explorando la

configuración del citoplasma y la fluorescencia nuclear obtenida con la acridina-naranja se puede determinar:

1. Estatus hormonal con relación al ciclo menstrual.

2. Valorar la necesidad de terapia estrogénica.

3. Evaluar la necesidad o eficacia de progesterona o progestógenos como soporte en estados precarios de estos durante el embarazo.

4. Determinación de ciclos anovulatorios o del tiempo aproximado de la ovulación.

Esta se puede considerar como la coloración ideal para estos estudios, porque la fluorescencia nuclear predomina, mientras el citoplasma sólo se colora lo suficiente para determinar su origen y configuración (9). Para su interpretación se sigue el siguiente criterio:

I. La presencia de núcleos muy pequeños, picnóticos, bien fluorescentes, se ve en células cornificadas. Cuando estas predominan en el frotis indican *efecto estrogénico alto*.

II. Cuando estos pequeños núcleos son más numerosos que núcleos de tamaño mediano, se interpreta como *efecto estrogénico moderadamente alto*.

III. Cuando el número de núcleos pequeños es igual al número de medianos o grandes, se habla de *efecto estrogénico moderado*.

IV. Únicamente núcleos medianos, significa *efecto estrogénico bajo*.

V. Núcleos de tamaño grande de células —parabasales—, se encuentra

en *deficiencia estrogénica*, como la que se observa en casos de vaginitis seniles.

VI. En casos de completa atrofia vaginal únicamente se observan células basales, caracterizadas por núcleos muy grandes, lo cual es indicativo de *marcada deficiencia estrogénica*.

VII. Células naviculares, caracterizadas por un marcado aumento de la refractibilidad en los bordes del citoplasma y núcleo de tamaño mediano, se observa en pacientes acíclicas (Embarazo, amenorrea, comienzo de la menopausia).

VIII. La actividad de progesterona se interpreta por el comportamiento de las células de núcleo mediano (intermedias y precornificadas) las cuales aparecen comprimidas, de bordes irregulares y tienden a conglomerarse en proporción a la actividad de ésta; así pues, hablamos de *efecto de progesterona marcado, moderado o débil*.

Para determinación de ovulación o de ciclos anovulatorios hemos encontrado este método ideal, porque la paciente misma puede tomarse los frotis, ya que estos no necesitan ser fijados. Se instruye a la paciente la manera de insertarse un "Tampax" en la vagina, de manera que un extremo quede en contacto con el cuello; éste debe ser insertado en la noche y removido en la mañana; inmediatamente debe rotarlo a lo largo del portaobjetos, el cual ha sido previamente numerado. Se aconseja tomar frotis los días 8, 12, 16, 20 y 24 del ciclo menstrual. Estos frotis son guardados por la paciente, y al final del ciclo ella los lleva a la consulta para ser examinados.

Durante el embarazo el frotis vaginal tiene un aspecto característico. En casos de feto muerto o amenaza de aborto la relación estrógeno-progesterona se altera, revelando un precario efecto hormonal (principalmente de la última). De esta manera, por medio de frotis vaginales se puede determinar qué pacientes van a necesitar soporte hormonal durante el embarazo evitando así el empleo de exámenes de laboratorio muy costosos, o el indiscriminado uso de hormonas (progestógenos) con las consecuencias que esto pueda traer.

Al tiempo de iniciarse el trabajo de parto o un poco antes, algunos autores han reportado efecto estrogénico (3), que se caracteriza por la presencia de células cornificadas y la disminución de efecto progestacional. Este efecto no ha sido constante en nuestras observaciones.

En casos dudosos de ruptura prematura de las membranas, Kushner y col. (5) en este hospital, observaron la presencia de células escamosas fetales anucleadas características del líquido amniótico que pueden ser muy bien demostradas por esta técnica.

B) *Diagnóstico etiológico de vaginitis* (4)

Muchos son los casos de leucorrea y vaginitis que van a la consulta del ginecólogo, los cuales deben ser tratados de acuerdo con su etiología para obtener un rápido y satisfactorio resultado con un mínimo de costo para la paciente. Empleando esta técnica, en pocos minutos (mientras la paciente se viste), se puede descubrir la presencia

de parásitos como tricomonas vaginales, hongos como monilia (*Candida Albicans*), o la deficiencia estrogénica típica de las vaginitis seniles.

C) *Diagnóstico de lesiones malignas y premalignas del tracto genital*

Las células malignas llaman la atención del observador por el aumento de la fluorescencia nuclear, la cual contrasta con las células normales del frotis al mover rápidamente el portaobjetos en el microscopio. Al detenerse y observar estas células con gran aumento, se nota irregularidad en la distribución de la cromatina nuclear y la relación núcleo-citoplasma está alterada, notándose un marcado aumento del tamaño nuclear. En lesiones premalignas (como displasia o marcado atipismo celular) se encuentran alteraciones similares pero en menor grado. De todas maneras estos frotis *sospechosos* deben ser examinados por un citólogo experimentado para su confirmación.

Presenta esta técnica un cambio tan radical en la utilización del microscopio en citología que aun personal con experiencia, requiere por muy corto tiempo, entrenamiento adecuado dirigido por personal especializado. Esta técnica ha demostrado ser excelente para eliminación de material negativo como procedimiento de consultorio aplicada por individuos aun con poca experiencia (7), dejando así los casos dudosos o sospechosos de malignidad para ser examinados por citólogos experimentados, con esta misma técnica o con cualquiera de los métodos convencionales y recordando que nunca una paciente deberá ser

tratada únicamente en base del diagnóstico citológico sin la confirmación histológica.

No sobra en este corto artículo hacer énfasis sobre la importancia de practicar exámenes citológicos periódicos en toda la población femenina por encima de 20 años de edad, si tenemos en cuenta que 125.000 mujeres mueren cada año en los Estados Unidos de cáncer y que ha sido probado en muchos centros de detección de cáncer que el 82%

de estos son curables si se descubren antes de la aparición de síntomas; tampoco debemos olvidar que son muchos los casos de carcinoma del cuello uterino reportados en mujeres entre 20 y 30 años de edad y que el carcinoma del cuello puede ser descubierto en el estado preinvasivo —*in situ*— utilizando la citología en forma rutinaria y periódica, cuando aun no hay síntomas o signos clínicos, lográndose una curación en casi el 100% de los casos.

BIBLIOGRAFIA

1. BERTALANFFY FELIX D.: Evaluation of the Acridine-Orange Fluorescence Microscope method for Cytodiagnosis of Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 93: 715, 1962.
2. BERTALANFFY L. VON, MASIN F. y MASIN M.: Use of Acridine-Orange fluorescence technique in exfoliative cytology. *Science*, 124: 1024, 1956.
3. BOTELLA LLUSIA JOSE: Obstetrical Endocrinology. *Charles C. Thomas, Publisher*. 1961, pág. 54.
4. KEARNS PAUL R.: Diagnóstico etiológico de vaginitis utilizando fluorescencia microscópica con acridina-naranja. *Comunicación personal*.
5. KUSHNER DAVID H., CHANG WHAN y VERCRUYSE JAKUES M.: Fluorescence Microscopy for Determination of Rupture Fetal Membrans by Vaginal Smear. *Obst. & Gynec.* 23: 197, 1964.
6. PAPANICOLAOU GEORGE N. y TRAUT HARBERT F.: Diagnostic value of vaginal smears in Carcinoma of the uterus. *Am. J. of Obst. & Gynec.* 42: 193, 1941.
7. RIVA H. L. y TURNER THOMAS R.: Fluorescence Microscopy in Exfoliative Cytology. *Obs. & Gynec.* 20: 451, 1962.
8. RIVA H. L., TURNER THOMAS R.: Further Experience with Fluorescence Microscopy in Exfoliative Cytology. A ten-second acridine-orange staining technique for cytologic cancer screening by fluorescence microscopy. *Am. J. Obst. & Gynec.* 85: 713, 1963.
9. RIVA H. L. and TURNER THOMAS R.: Rapid Hormonal Evaluation by Nuclear Size and Citoplasm Configuration. *Aceptado para publicación en Pacific Journal of Medicine and Surgery*.
10. WEID GEORGE L.: ¿Pap Test or Babes Method? *Acta Cytologica*, 8: 173, 1964.