FLUORESCENCIA MICROSCOPICA CON ANARANJADO DE ACRIDINA PARA DIAGNOSTICO DEL CANCER GINECOLOGICO

*Dr. Jorge E. Medina Murillo**

Introducción

Papanicolaou en los Estados Unidos y Babes en Rumania en el año de 1928, hicieron las primeras publicaciones sobre el uso de la Citología Exfoliativa para el diagnóstico del cáncer. Sin embargo solo hasta el año de 1943, en que Papanicolaou y Traut publicaron la clásica monografía titulada "Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear" (12), recibió este método acogida en el seno de la ciencia Médica.

Hoy es un hecho reconocido universalmente que la Citología Exfoliativa va a la vanguardia como procedimiento de diagnóstico en la batalla contra el cáncer. Esto ha ocasionado una tremenda demanda de personal capacitado y de métodos Citológicos que faciliten su empleo para grandes grupos de población. Con el fin de lograr estos objetivos numerosos investigadores han trabajado en descubrir nuevos métodos y fue así como apareció el uso de la Fluorescencia Microscópica por Schummelfender en 1948-49 (10), quien demostró que células tumorales coloreadas con Anaranjado de Acridina se podían observar más fácilmente que por los métodos convencionales.

En los Estados Unidos Friedman, Mellors y otros emplearon métodos

con Fluorescencia sin resultados satisfactorios hasta que el año de 1956 Von Bertalanffy (2) introdujo el empleo del Anaranjado de Acridina usándola con un pH de 6.

Por este método los ácidos nucleicos ADN (Acido Desoxiribonucleico), y ARN (Acido Ribonucleico), se diferencian por el color produciendo el ADN del núcleo Fluorescencia verde amarillenta y el ARN del citoplasma, una Fluorescencia café rojiza o rojo vivo dependiendo de la cantidad de éste en la célula. En las células malignas hay aumento considerable del ADN y ARN debido al aumento en la síntesis proteica ocasionada por la rápida formación de células malignas hijas. Este método ha tenido gran aceptación, pero los resultados obtenidos por Von Bertalanffy no han sido reproducidos con igual exactitud por otros investigadores, entre ellos Dart y Turner (4) quienes hallaron en exceso de Fluorescencia roja bastante confuso para la interpretación puesto que bacterias y tricomonas también toman el color rojo, y lo contrario, células degeneradas con cambios autolíticos podían no mostrar el aumento de fluorescencia roja del citoplasma y pasar así inadvertidas células tumorales si no se tenían

* Departamento de Ginecología y Obstetricia. Universidad Javeriana.

en cuenta los caracteres del núcleo para el diagnóstico de malignidad.

Teniendo en cuenta hallazgos como éstos Riva y Turner (16) en el Laboratorio de Investigación del Hospital General Walter Ree den Washington, D. C., encontraron que trabajando con Anaranjado de Acridina con un pH por debajo de 4 se elimina la fluorescencia de ARN en la mayoría de las células y se utiliza como criterio diagnóstico únicamente en fluorescencia producida por el ADN del núcleo empleando además los criterios básicos de la morfología celular descrito por Papanicolaou.

Con este método se simplificó tremendamente la lectura de extendidos ya que el aumento de la fluorescencia de los núcleos anormales hace detener inmediatamente al examinador para entrar entonces a estudiar los caracteres morfológicos de las células.

Riva y Turner (17) entre abril de 1958 y febrero de 1959 examinaron 8.200 preparaciones de material ginecológico y obstétrico del Hospital Walter Reed, comprobando Histológicamente malignidad en el 51,86% de las citologías clase III y IV y 902% de los extendidos clase V. Los prime-

ros 4.995 extendidos los decoloraron y procesaron nuevamente por el método de Papanicolaou, encontrando estadísticamente resultados similares a los obtenidos por la técnica de Papanicolaou, demostrando una perfecta correlación diagnóstica. Además los estudios de Batt (3) Kawasaki y Wilson (9), Kauffman y col. (10), han demostrado la utilidad práctica de este método, habiendo encontrado estadísticamente resultados similares a los obtenidos por la técnica Papanicolaou.

Material y Métodos

Durante el año de 1966 se tomaron en la consulta externa del Hospital Universitario San Ignacio extendidos cérvico-vaginales a 3.441 mujeres que concurren a las consultas de Ginecología, prenatal, esterilidad, planificación familiar y medicina general. Todos los extendidos se procesaron por el método de Riva-Turner (16). Algunas de las Citologías sospechosas o positivas, se colorearon también por el método de Papanicolaou encontrándose perfecta correlación; para la interpretación se siguió la clasificación de Papanicolaou. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla N° 1.

TABLA N° 1

HOSPITAL DE SAN IGNACIO

CITOLOGIA CERVICO-VAGINAL — ENERO 1° A DICIEMBRE 31 DE 1966

Citologías negativas (Clase I y II)	3.384	98,35 %
Citologías sospechosas (Clase III)	40	1,16 %
Citologías positivas (Clases IV y V)	17	0,49 %
TOTAL:	3.441	100,00 %

Las Citologías clase I y II se consideraron como negativas; sin embargo toda lesión sospechosa del cérvix a pesar de presentar Citología negativa, fue biopsiada y el estudio histológico

co no reveló malignidad en ningún caso. Las Citologías clase III fueron consideradas como "Sospechosas de malignidad", y por lo tanto se les abrió una tarjeta especial en los la-

boratorios de Citología para seguir de cerca la evolución de estos casos. Siempre estas Citologías se repitieron después de tratar las causas inflamatorias locales como tricomoniasis, vaginitis inespecífica, etc.

Solo en aquellos casos en que después de repetir la Citología persistió como clase III o fue clase IV o V, se obtuvieron biopsias o se practicó co-

nización del cuello uterino para estudio Histológico.

Para analizar la relación entre el estudio anatomopatológico de las biopsias obtenidas y la citología, hemos dividido los resultados histológicos en tres grupos: A. Lesiones benignas. B. Lesiones benignas consideradas como premalignas. C. Lesiones malignas.

TABLA Nº 2

CITOLOGIAS SOSPECHOSAS O POSITIVAS

	III	IV	V	Total
Se negativizaron	20			20
Perdidas de vista	7	1		8
Con estudio histológico	13	7	9	29
TOTAL:	40	8	9	57

Resultados

En la Tabla Nº 2 vemos como hubo un total de 57 pacientes que presentaron citologías clase III, IV o V; 20 citologías clase III se negativizaron al repetirlas y por lo tanto no se ob-

tuvo estudio histológico; 7 se han perdido de vista, a pesar de los esfuerzos de las visitadoras sociales del Hospital para encontrarlas. Se han obtenido biopsias y conizaciones en 29 pacientes.

TABLA Nº 3

RELACION DE LA CITOLOGIA CON EL ESTUDIO HISTOLOGICO

Clase III	2 (15,4%)	5 (38,4%)	1 (7,7%)	4 (30,7%)	1 (7,7%)	13 100%
Clase IV		2 (28,5%)		1 (14,2%)	4 (57,2%)	7 100%
Clase V	2* (22,2%)				7 (77,8%)	9 100%
TOTAL	4	7	1	5	12	29

* Una paciente presentaba piometría.

En la Tabla Nº 3 analizamos el resultado del estudio histopatológico con relación a la citología; de las 13 citologías clase III el 38,4% correspondió a carcinoma de cérvix, siendo In Situ (30,7%); uno invasivo (7,0%). Cinco casos (38,4%) correspondieron a las lesiones atípicas del epitelio cervical incluidas en el grupo de "Displasia" un caso corres-

pondió a hiperplasia adenomatosa del endometrio y solo dos casos (15,4%) correspondieron a cervicitis.

Las citologías clases IV correspondieron a dos casos de displasia (28,5%) y a cinco casos de carcinoma: uno In Situ y 4 invasivos. En las citologías clase V correspondieron a cervicitis 2 (uno de estos asociado a

TABLA N° 4

ASPECTO DEL CERVIX

	Cervi- citis	Dis- plasia	Carcinoma — 0 I II	Estados II	Clínicos III	IV	Total
Sano	1	4	2				7
Cervicitis	1			1			2
Erosión	1	3	3				10
Ectropión	1	1					2
Ulceración				1			1
Tumor				1	2	3	7
TOTAL	4	8	5	5	3	3	29

piometría) y 7 a carcinoma invasivo. (77,8%).

En la Tabla N° 4 se presenta la relación que existió entre el aspecto clínico del cérvix y los resultados

anatomopatológicos de 29 casos. Es interesante anotar que 9,0 o sea el 31% de los casos de carcinoma del cuello uterino no se sospecharon clínicamente y fue la presencia de las citologías positivas lo que motivó el estudio histológico en estos casos.

TABLA N° 5

RELACION ENTRE EL ESTADO CLINICO Y LA CITOLOGIA

Citología	0	CARCINOMA I	ESTADOS II	CLINICOS III	IV	Total
Clase I y II						
Clase III	4	1				5
Clase IV	1	3	1			5
Clase V		1	3	2	1	7
TOTAL	5	5	4	2	1	17

En la Tabla N° 5 se analiza la relación entre el estado clínico en los 17 casos de carcinoma del cérvix y los resultados citológicos. Llama la atención que 5 citologías clase III correspondieron a 4 casos de carcinoma In Situ y a un caso de carcinoma invasivo estado I, lo cual nos indica importancia de investigar las citologías clase III o sospechosas. La paciente más joven con carcinoma In Situ tenía 23 años, la más vieja 49 y el promedio de edad fue 34 años. Para el carcinoma invasivo el promedio fue 43 años 9 más que para el In Situ; variando la edad entre 33 y 56 años.

Comentario

No es el objeto de este estudio detenernos a analizar interesantes aspectos sobre el diagnóstico precoz del carcinoma del cuello uterino, ni sobre factores epidemiológicos del mismo, que serán materia de posteriores estudios, ni tampoco de demostrar la importancia de la Citología Exfoliativa para el diagnóstico temprano del cáncer genital femenino, lo cual ha sido plenamente demostrado en nuestro medio (8), (14), (19).

Nuestro interés ha sido analizar la utilidad de la fluorescencia Micros-

cópica por el método de Riva-Turner para el diagnóstico del cáncer ginecológico. Para lograr este propósito haremos algunos comentarios sobre los resultados obtenidos.

En un total de 3.441 mujeres examinadas en la consulta externa del Hospital Universitario de San Ignacio, se encontraron 17 casos de carcinoma del cérvix o sea 4,9 por mil, cifra comparable a la encontrada por Pardo sobre un total de 6.427 mujeres examinadas en centro de diagnóstico precoz de cáncer, donde él reporta una rata de 4,8 por mil para carcinoma de cuello uterino o a la reportada por Isaza Mejía en Medellín sobre un total de 50.856 con una rata que oscila entre el 3,7 y el 4,5 por mil.

Analizando las 40 citologías clase III o sospechosas encontramos que 20 se negativizaron después de tratamiento para procesos inflamatorios locales, 4 de estas fueron debidas a tricomonas; de las 13 en que se obtuvo tejido para estudio histológico, solo 2 o sea el 15,3% correspondieron a cervicitis. Es interesante anotar que de los siete casos de displasia 5 fueron con citología clase III. El término Displasia fue acordado en el primer Congreso de Citología Exfoliativa por el Comité de Definiciones Histológicas para Carcinoma de Cuello Uterino (13), sinónimo de hiperplasia atípica, marcado atipismo, marcada hiperactividad de células basales, etc. Varios investigadores han demostrado que eventualmente 2 al 4% de estas lesiones progresan hacia carcinoma In Situ (1), (5), Friedel (6) encontró en casi todos los casos de carcinoma In Situ tratados por histerectomía, zona de displasia entre las áreas de carcinoma In Situ y las áreas de epitelio normal. Esto nos demuestra la importancia de detectar para Citología estas lesiones, ya que

en la práctica las debemos considerar como pre-malignas y debemos seguir muy de cerca a estas pacientes.

La hiperplasia adenomatosa del endometrio encontrada en un caso de citología clase III también es considerada como lesión premaligna (7).

Cinco de las citologías clase III correspondieron a 4 casos de carcinoma In Situ y un caso de carcinoma invasivo.

Basados en lo anterior podemos decir que la citología clase III debe ser estudiada cuidadosamente repitiéndola siempre antes de procurar biopsias y después de haber eliminado causas inflamatorias como responsable de esta, para no pecar por alarmista innecesariamente y tomar biopsias innecesarias, pero tampoco incurrir en negligencia e ir a dejar pasar inadvertida una displasia o un carcinoma temprano. Parker y col. (15) reportan 58,1% de los casos de carcinoma In Situ con citologías clase III, Mussey y Soule (11) reportan 23%. En nuestro estudio estos cinco casos de cáncer de citología III corresponden al 29% de los casos de cáncer y al 80% de carcinoma In Situ.

Otro aspecto interesante de contemplar es el número de casos de carcinoma In Situ con relación al número total de casos de carcinoma del cérvix descubiertos en este estudio; vemos que sobre un total de 17 casos, 5 fueron intraepiteliales o sea el 29,4% que al compararlo con el Registro Nacional de cáncer en 1964 (20) correspondió al 8,3%. Es interesante también llamar la atención sobre el hecho de que 10 de los 17 casos de cáncer o sea el 58,8% correspondieron a estados 0 y I solo el 41,2% a estados avanzados. También llama la atención que 9 o sea el

TABLA N° 6

CUADRO COMPARATIVO CON ESTUDIOS SIMILARES EN BOGOTÁ

	Pardo ()	Santamaría ()	Medina
Total de mujeres examinadas	6.427	5.000	3.441
Número de Ca. de cérvix	31	85	17
Rata por mil	4.8	17	4.9
Rata de Ca. In Situ %	22%	33,7%	29,4%
Técnica empleada	PAP	PAP	Anaranjado de acridina

52,9% de los casos de cáncer no se sospecharon clínicamente y fue la presencia de citologías positivas lo que motivó el estudio histológico en estos casos.

La Tabla N° 6 nos muestra como estadísticamente los resultados obtenidos por el método de fluorescencia son comparables a los resultados de los otros investigadores que han obtenido con el método de Papanicolaou en nuestro medio.

Para complementar el análisis objetivo de nuestra experiencia con el uso del Anaranjado de Acridina quisiera mencionar las ventajas prácticas que Schumelfeder describe acerca de la fluorescencia microscópica (20).

1. La técnica es simple y rápida, necesitándose un solo colorante.

2. La coloración de las láminas se hace muy rápidamente y los defectos de tinción son menos frecuentes que con otras técnicas.

3. La fluorescencia amarilla verdosa del núcleo permite conclusiones relacionadas con la estructura de la cromatina y la hiperchromasia que son fácilmente detectables.

4. El moco y los elementos rojos de la sangre no molestan porque ellos toman muy poca o ninguna fluorescencia.

5. Los micro-organismos se pueden demostrar en forma más clara y evidente que con la técnica de Papanicolaou.

6. Es posible decolorar los extendidos y colorearlos por el método deseado (Papanicolaou. etc.).

7. Cuando se desea un método de diagnóstico rápido, la fluorescencia con Anaranjado de Acridina es un método fácil y rápido.

8. Además de las ventajas citadas por Schumelfeder, Riva y Turner demostraron que láminas sin fijar no presentan ninguna diferencia con lámina previamente fijadas, factor este que simplifica enormemente la toma y envío de las muestras.

La experiencia de Schumelfeder está de acuerdo con la de Dart Turner (4) y Riva y Turner (16) en que no solo, el aumento de la fluorescencia nuclear es importante para el diagnóstico del cáncer, sino también el criterio morfológico descrito por Papanicolaou debe tenerse en cuenta.

Conclusión

Aunque el valor estadístico de este trabajo lo considero limitado por ser el número de pacientes examinadas aún reducido; y el tiempo de estudio un año, sin embargo nos podemos dar cuenta claramente que el método de Fluorescencia Microscópica descrito

por Riva-Turner empleado en este estudio es comparable a resultados obtenidos en estudios similares en nuestro medio con el método de Papanicolaou, lo cual nos estimula a continuar empleándolo.

Sumario

1. Se expone brevemente el fundamento del estudio del método de Fluorescencia Microscópica con Anaranjado de Acridina descrito por Riva y Turner.

2. Se analizan los resultados obtenidos en 3.441 mujeres examinadas durante el año de 1966, en el Hospital Universitario San Ignacio.

Se encontraron 17 casos de carcinoma del cuello uterino lo que corresponde al 4,9 por mil. El 29,4% correspondieron a carcinoma In Situ.

REFERENCIAS

- 1 AIRE, J. E. Cytological Behavior Patterns in Premalignant Lesions of the Cervix. Proceedings of the first International Congress of Exfoliative Cytology. Pág. 94, 1961.
- 2 BERTALANFFY L. VON, MASIN F. y MASIN M. Use of Acridine. Orange Fluorescence Technique in Exfoliative Cytology. Science, 124: 1.024. 1956.
- 3 BATT R. E. Fluorescence Microscopy in Exfoliative Cytology. Obst. & Gynec. 24: 248, 1964.
- 4 DART, L. H. y TURNER, T. R. Fluorescence Microscopy in Exfoliative Cytology. Laboratory Investigation, 8: 1.513, 1959.
- 5 DOUGHERTY, C. M. TORRES, J. y COTTEN, N. The fate Atypical Hyperplasia of the Uterine Cervical Epithelium. Proceedings of the first International Congress of Exfoliative Cytology. Pág. 103. 1961.
- 6 FRIEDEL, G. H. Premalignant Lesion of the Cervix: Pathology. Clinical Obst. & Gynec. 5: 1.127, 1962.
- 7 GORE, G. y HERTIG, A. T. Premalignant Lesion of the Endometrium. Clinical Obst. & Gynec. 5: 1.148, 1963.
- 8 ISAZA MEJIA, G. y RODRIGUEZ RODRIGUEZ L. Informe Estadístico sobre cincuenta mil ochocientos cincuenta y seis (50.856) Citologías en I.C.S.S. de Medellín, Colombia. Rev. Col. Obs. y Gynec. XVI: 445, 1965.
- 9 KAWASAKI, D. M. y WILSON, J. H. Office Applications of Rapid Acridine Orange Technique. Using Fluorescence Microscopy. Obs. & Gynec. 22: 636, 1963.
- 10 KAUFMAN, R. H., TUXWORTH, E. F. y WALLACE, J. L. An Evaluation of Fluorescence Microscopy in Exfoliative. Vaginal Cytology. Southern Med. J. 57: 33, 1964.
- 11 MUSSEY, E. SOULE, E. H. Carcinoma In Situ of the Cervix. Am. J. of Obst. & Gynec. 77: 957, 1959.
- 12 PAPANICOLAOU, G. N. and TRAUT, H. R. Diagnosis of Uterine Cancer By The Vaginal Smear. Commonwealth Fund, New York, 1943.
- 13 Proceedings of the International Committee Terminology for Lesions of the Uterine Cervix. Proceedings of the International Congress of Exfoliative Cytology. Pág. 283, 1961.
- 14 PARDO VARGAS, F. Cáncer del cuello uterino. Su pesquisa en 6.427 mujeres. Rev. Col. de Obst. y Gynec. XVII: 107, 1966.
- 15 PARKER, R. T. y col. Intraepithelial (Stage) cáncer of the Cervix. Am. J. of Obst. & Gynec. 80: 693, 1960.
- 16 RIVA, H. L. y TURNER T. R. Fluorescence Microscopy in Exfoliative Cytology. Obst. & Gynec. 20: 451, 1962.
- 17 RIVA, H. L. y TURNER T. R. Further Experience with Fluorescence Microscopy in Exfoliative Cytology. Am. J. of Obst. & Gynec. 85: 713, 1963.
- 18 Registro Nacional de Cáncer. Boletín del Comité Nacional de Lucha contra el Cáncer. 14: 19. Junio de 1965.
- 19 SANTAMARIA A. y VILLARREAL J. Citología Vaginal Positiva. Sin publicar.
- 20 SCHUMMELFEDER. The Consultant. Acta Cytológica. 8: 454. 1964.