



## De la Citometría de Flujo en Tejidos Sólidos a la Endomicroscopía Confocal.

**Dr. Fernando Kawaguchi MD. PhD, (1). Dr. Oscar Venegas MD.(2) JL Castillo Mag Cs. (3) Ing. Alfredo Zepeda (4) Ing. Alejandro Sepúlveda (5) Dr. F. Mucientes (6) Dr. Jaime Madariaga (6). Dr. R. Klassen**

1. Profesor asociado, Unidad de Gastroenterología Hospital del Trabajador. Dpto. Medicina Interna. Facultad de Medicina Universidad de Concepción.
2. Profesor asistente, Dpto. de Pediatría, unidad de Inmunología y Citometría de flujo.
3. Magíster en Ciencias y jefe de a Unidad de Citometría de Flujo.
4. Ingeniero Adjunto al Proyecto.
5. Ingeniero Coordinador del Proyecto Cooperativo Internacional.
6. Dpto. Anatomía Patológica, Facultad de Medicina Universidad de Concepción.

### RESUMEN

Desde el punto de vista de la oncología digestiva, los avances logrados en esta área, han superado lo que la endoscopia digestiva podría haber imaginado.

En el hecho , los progresos tecnológicos de algunas compañías japonesas que han optimizado esta técnica endoscópica hasta niveles sorprendentes, como es la magnificación y la cromo endoscopia virtual, junto a la Endosonografía Terapéutica y el doppler; han permitido un avance que pretende armonizar conceptos endoscópicos-endosonográficos e histológicos.

La aparición de la "Endomicroscopía-Confocal" , elaborada por una empresa japonesa, viene a revolucionar aun mas el campo de la endoscopia digestiva, desconcertando prácticamente a muchos gastroenterólogos desvinculados de la Inmunopatología de las mucosas y de la biología celular de estos tejidos, área de la medicina que siempre se había pensado, correspondía a las ciencias básicas.



Es indudable que la "Endomicroscopía Confocal", viene a corroborar los intentos de algunos científicos japoneses y alemanes que desde hace mas de 20 años, intentan demostrar la utilidad de la biología Celular y Molecular aplicada a la ciencia , basada en la evidencia.

Para demostrar este concepto debería remontarme a la primera publicación que apareció en la revista Medica de Chile en el año 1993; en el cual se demostraba la utilidad.

De la "Citometría de Flujo" en el estudio de los tumores sólidos, para lo cual se hacia necesario, tomar estas muestras endoscópicas pero no fijarlas en formalina ni hacerles cortes con micrótomos; sino que al contrario, la idea era conservarlas en un medio fisiológico liquido y luego separarlas con la técnica de separación celular mediante pepsina tripsina colagenasa; en un "all night"; situación que luego se perfecciono, hasta dejarlas en tratamiento enzimático solo por algunas horas; con el objetivo de provocar el menor debris Posible.



Posteriormente se pasaban por Vortex. Y se teñían con sustancias fluorescentes, dependiendo de los elementos intracelulares que uno pretendía estudiar.

Fue así como nace el estudio del ADN celular; el índice de ADN; la ploidia con su diploidia, triploidia y tetraploidia; mas la fase S y su índice de proliferación celular.

Estos conceptos remecían el ambiente gastroenterológico y oncológico digestivo; permitiendo a ciertos especialistas descalificar esta técnica incipiente por los resultados que no siempre se correlacionaban con el tipo de ploidia y el tipo histológico ni la agresividad real del tumor.

Faltaba quizás de contar con un nuevo concepto oncológico, cual era, el Grado de diferenciación biológica en los tumores gástricos.

Pues, indudablemente que la Heterogeneidad Celular que podría llegar a tener un tumor avanzado de grandes dimensiones, era mucho Mayor que un cáncer gástrico precoz con un tamaño de pocos milímetros.

Esta situación resultó aún más difícil de Comprender, cuando aparece el análisis metodológico del análisis mediante "Citometría de flujo" de tumores gástricos sólidos pero ahora con un grado de complejidad mayor, pues correspondió a tumores que habían sido fijados en formalina y en los que la técnica de disgregar el tejido enzimáticamente por vortex y mediante medidas físicas como el nylon mesh, era aún más difícil; por cuanto estas células fijadas en formalina a veces durante años, permanecían muchas de ellas con un grado de deshidratación menor, requiriendo un nylon mesh; ya no de 40 micrones, sino que de dimensiones menores; con el objetivo de evitar el mayor debris celular que significaba destruir las células vecinas a la que estaba bajo estudio fluorocitométrico Con esta nueva técnica, se pretendía provocar un impacto tanto en el ambiente gastroenterológico como también entre los oncólogos y principalmente entre los patólogos.

**(Kawaguchi, sept 1993, Rev Médica Chile).**

A pesar de que estaba consciente de que era un desafío mayor intentar integrar conceptos propios de las ciencias básicas en un modelo multiparamétrico que utilizaba técnicas de digestión enzimáticas, vortex, pipetas, sustancias fluorescentes específicas; y mas encima la idea de un haz de láser entre 488 a 522 manómetros bajo un sistema de espejos que finalmente impactaban a cada una de estas células que iban pasando en fila india luego de haber sido separadas mediante las técnicas ya descritas.



Finalmente se cargaban positivamente o negativamente las células que cumplían con las condiciones establecidas como de normalidad; y se separaban en 2 tubos distintos, logrando cuantificar el número de células con características de ploidia y de proliferación celular determinada.

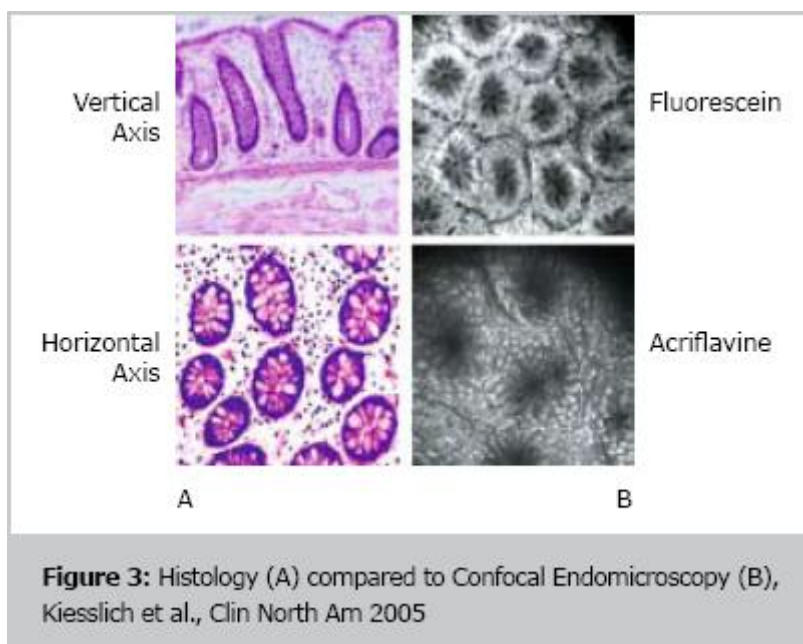
La posibilidad posterior de que estos tubos conteniendo estas células cuantificadas; con las características de normalidad y de no normalidad pudieran ser analizadas mediante técnicas de PCR hacia mucho mas interesantes este estudio fluocitométrico; y de allí a soñar con el uso de la inmunología para una lectura inmunoterápica; "era uno de los sueños más acariciados por todos nuestro grupo de Japón y de Concepción."

**(1999, Castillo, Kawaguchi et als. Revista Medica de Chile).**

Existían unos cuantos argumentos que impedían validar completamente el estudio fluocitométrico en tejido fijados; uno de ellos, era el tiempo de transporte entre la toma de la muestra biopsica en el momento de la fijación en formalina; el otro era la concentración a la cual eran sometidas estas muestras de tejido gástrico. Todas ellas eran variables que se habrían optimizado, si hubieran sido evaluadas como un método complementario al análisis histopatológico.

En todo caso, la Revista Medica de Chile, tomó la visión de valorar esta proyección del análisis fluocitométrico en tejidos sólidos; como un arma fundamental para apoyar el pronóstico de estas lesiones gástricas. ([www.oncoimmun.co.cl](http://www.oncoimmun.co.cl)) ([www.udec.cl/oncogastro](http://www.udec.cl/oncogastro)).

Desde esa fecha que el interés personal y del grupo de Citometría de flujo tanto en Japón como en Concepción era el poder lograr una técnica que pudiera simplificar todo este proceso, haciendo mas fácil todo el concepto del estudio citométrico en tejidos, brindándole con esto un apoyo a todo el resto de las patologías tumorales tempranas y avanzadas de otros órganos, mas allá del tubo digestivo. ([www.oncoimmun.co.cl](http://www.oncoimmun.co.cl)); hasta que observamos atónitos como el grupo de Kyushu en Japón, logra que la Revista "Endoscopy" le acepte el 8 de junio del 2006 un estudio in vivo y ex vivo de una tecnología endoscopica nueva, pero metodológicamente ya muy antigua, que permitía la visualización in vivo de las células mediante sustancias fluorescentes, impactadas por un láser.



Esto no es la cromo-endoscopia tradicional es simplemente la fusión de la endoscopia con el método de la Citometría de flujo, con imágenes digitalizadas de las células, que además utilizaban la ventaja de la técnica de la magnificación endoscópica, sin necesidad de tomar una muestra biopsia.

De esta manera el grupo de Kyushu empleó esta técnica en 27 pacientes con cáncer gástrico; observándoles in vivo mediante una sustancia fluorescente, denominadas acriflavina-(+) fluoresceína de sodio mediante inyección endovenosa El desarrollo de una técnica como esta, en la que se utiliza:

- La técnica de magnificación endoscópica, hasta un 100x, lo que permite observar microvasculatura. En el tracto gastrointestinal (3)
- El desarrollo reciente de un sistema de libre óptica para endomicroscopia confocal (Optiscan imaging Pty.Lh,Melbourne,Victoria Australia) en la región distal de un videoendoscopio convencional, lo que permite la observación del tejido a nivel celular. (24)
- La publicación reciente en la literatura de un sistema de endoscopia Confocal, utilizando el scanner de un láser en células gástricas in vivo, tratadas previamente mediante fluoresceína (Fluoview, Tokio, Japón) ( 5,6).

Estos reportes demuestran que la microscopia Confocal utilizando el sistema del láser, permiten observar imágenes que se corresponden en un 100% con las imágenes, en las que se ha utilizado el método tradicional de la tinción mediante la tinción con hematoxilina-eosinica.



En éstos trabajos se demuestra además la similitud de los estudios endoscópicos confocales utilizando sustancias fluorescentes con los obtenidos para el análisis biológico celular de la citometría de flujo.(7,8).

## PACIENTES Y METODOS.

El sistema Confocal endoscopico que utiliza este sistema de sustancias fluorescentes en conjunto con el sistema de argón láser a 488 nm de excitación y con una detección cercana a las 515 nm; incorporado al set endoscopico; con emanación de luz, el cual es normalmente producido por la fluoresceína, es recapturado dentro del mismo sistema de fibra óptica. En resumen las imágenes confocales fueron recolectadas mediante una velocidad de escaneo de 0.8 por segundos ( 1024 x 1024 pixeles). a 1.6 x segundo. ( 1024x 512 pixeles). Los cortes ópticos fueron obtenidos con un grosor de 7 micrones, con una resolución lateral de 0.7 micrones; las imágenes confocales fueron generadas simultáneamente por las imágenes ópticas.

## EXAMEN IN VIVO DE LA MUCOSA GASTRICA.

Para corroborar el potencial diagnostico del endomicroscopio Confocal, el examen in-vivo del tracto digestivo alto, se realizó en 9 pacientes; 5 con gastritis y 4 con cáncer gástrico.

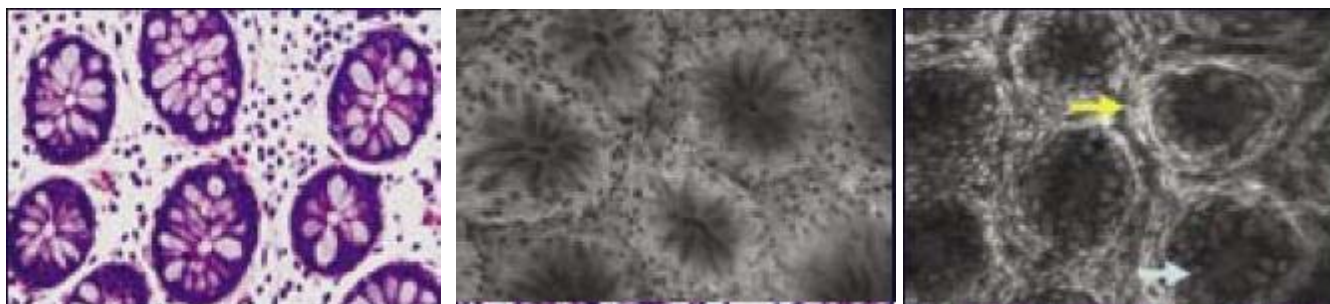
El consentimiento informado fue obtenido de todos los pacientes.

El endomicroscopio Confocal flexible ( Entiendase un endoscopio con atributos especiales) fue introducido en el esófago y estómago de todos los pacientes.

La fluoresceína de sodio ( 5 ml de una solución estéril al 10%) fue inyectada por vía endovenosa y controlada por una angiografía . ( 0.5 grs/ 5 ml)

Después de algunos minutos de inyectada la fluoresceína esta fue impregnando la pared gástrica y la mucosa .

En cada imagen el endomicroscopio Confocal fue colocado en un contacto cercano con la superficie mucosa, luego de teñir con la sustancia fluorescente de contraste.





## MEDICION DE AREA NUCLEAR.

El área nuclear fue medida usando un procesador de imágenes ( Un software. NIH Scion Image.1.61. Scion Corp ; <http://www.scioncorp.com/>).

Utilizando un analizador de partículas automático se logró medir el área nuclear (+ - desviación estándar), utilizando mas de 100 áreas correspondientes a núcleos celulares en cada caso.

Las diferencias en el área nuclear, obtenidas estadísticamente entre mucosa normal y cancerosa fue evaluada utilizando la Técnica de Student.

Una posibilidad menor a 0.05 fue considerada estadísticamente significativa.

## RESULTADOS:

La gran diferencia entre una evaluación microscópica de un corte histológico tradicional y uno obtenido por esta imagen Confocal, es que en el 1° caso uno puede observar el corte seccionado verticalmente en la imagen Confocal, la sección es transversal paralela a la superficie del tejido.

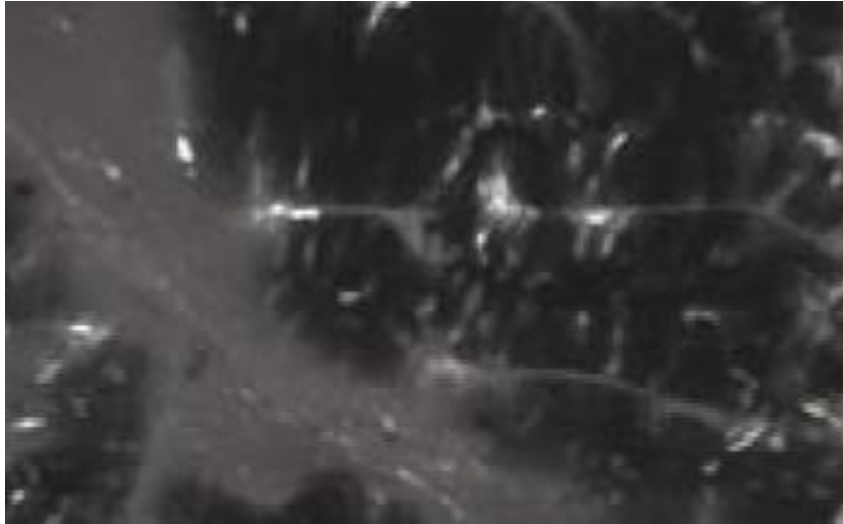
El cáncer gástrico evaluado celularmente se logró obtener en un 80%, tomando como gold Standard la histología. Además se evaluaron parámetros citológicos (como cambios en el tamaño y forma del núcleo, pérdida de la polaridad y prominencia del nucleolo)

Además se evaluaron los cambios estructurales. (Engrosamiento de las glándulas, irregularidad de las mismas, glándulas back to back ), lo que mejoro aun mas el sistema de diagnóstico.

Para este estudio se le solicitó a un endoscopista de experiencia y a un patólogo experto en patología digestiva que evaluaran estos resultados, lográndose en ambos casos una sensibilidad de 92, 6 % para el endoscopista y de 88.8% para el patólogo (observando la imagen Confocal), y una especificidad de un 100% para ambos especialistas.

# Bioarrayanes

Centro de Estudios Médicos Enfermedades Gastroenterológicas



Fluoresceín revela la arquitectura mucosal donde la Arciflavina ayuda a desenmascarar al *Helicobacter Pylori* el cual se adhiere a la superficie mucosal o dentro de las glándulas gástricas. (contrast agent: Acriflavine hydrochloride 0.05%, 15ml and Fluoresceín 10%, 5ml)



Magnificación x 1,000 identifica al *H. Pylori* con su forma característica y la presencia de flagelos (contrast agent: Fluoresceín 10%, 5ml)



## DISCUSION.

La imagen Confocal no es una alternativa a la histología; es simplemente un complemento, que se hace en el momento del diagnóstico endoscópico; y en el cual, la corrección de un corte vertical para evaluar profundidad de invasión en la pared y la invasión ganglionar; se puede completar perfectamente con un

endosonógrafo radial; lo cual transforma al procedimiento endoscópico en un examen muy completo del tipo de tumor ; mientras se espera el resultado definitivo del patólogo.

Cabe hacer notar su relevancia en aquellos casos en los cuales se desafía toda la habilidad del patólogo en una biopsia rápida; pudiendo complementarse previamente por un método de diagnóstico como este.

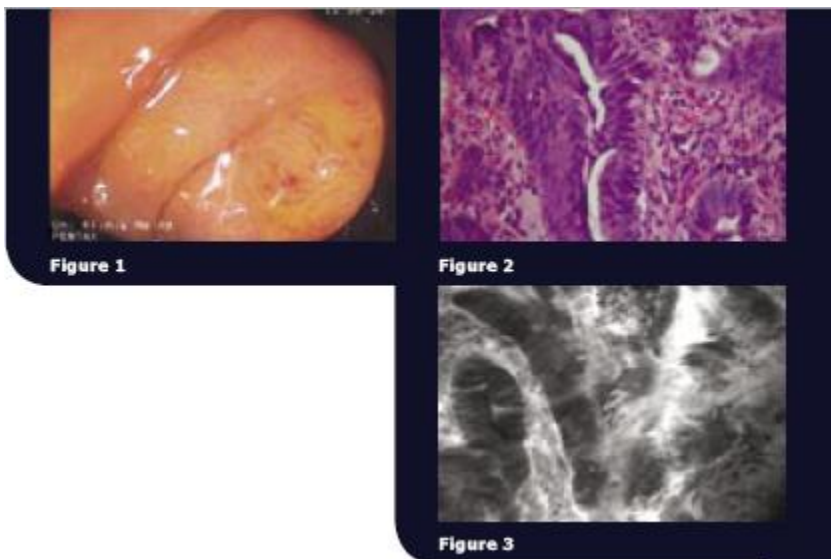
Resumimos, que la imagen Confocal tiene además la gran ventaja sobre la Citometría de flujo convencional; que sabemos exactamente las células que estamos evaluando; complementado con una imagen horizontal que permite imaginarse el tejido superficial de la mucosa con una profundidad de hasta 250 micrones desde la superficie.

De todas maneras, insisto en que el gold Standard es la histología, con la única diferencia que ahora el endoscopista podrá tener mayores argumentos al sostener Reuniones Anatomoclinicas en las que existen dudas acerca del origen de la muestra y la relación estructural con el tejido vecino, tanto en el corte vertical como en el transversal.

La endomicroscopia Confocal de la mucosa del tracto gastrointestinal, permite describir el análisis morfológico de las imágenes obtenidas mediante la microendoscopia de fluorescencia. (9).

En relación al tipo histológico, la diferenciación del núcleo y su correlación con el ADN y su ploidía demuestra que es absolutamente compatible con los estudios de ploidía obtenidas mediante la Citometría de flujo tradicional. (10).

La administración endovenosa de sustancias fluorescentes mejora notablemente el diagnóstico pero debemos tener cuidado de utilizar productos biológicamente no tóxicos (11), como la acrofilavina o la fluoresceína de sodio.



## REFERENCIAS:

1. F. Kawaguchi, K. Shimokawa, K Ikeda. Revista medica de Chile 1993.
2. JL Castillo, F Kawaguchi et als. Revista medica de Chile 1999.
3. Yotsuka; Yniwa, N Ohmiya et als. Usefulness of magnifying endoscopy in the Diagnosis of early gastric cancer. Endoscopy 2004, 36; 165-169.
4. R . Kieselich; J Buy, M Viet et a als. Confocal laser endoscopy for diagnosis of intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. Gastroenterology 2004; 127; 706-703.
5. H. Inove; JY Cho, H. Satodate et als. Development of virtual histology and virtual biopsy using laser, scanning confocal microscopy in vitro with untreated fresh specimens from the gastrointestinal mucosa. Scand J/ Gastroenterol Suppl 2003;237;37-39.
6. H Inove, JY Cho, H Satodate et als. Anovel method of virtual histopathology using laser scanning confocal microscopy in vitro whit untreated fresh specimens. Endoscopy 2000; 32; 439-443.
7. P. Hytiroglow, N Harpaz, J Ds Heller. et als. Differential Diagnosis of borderline and invasive serous. Cystadecarcinomis of the ovary by computerized interactive morphometric analysis of nuclear features. Cancer 1992; 69; 988-992.
8. J Mulder, G. Offerhans. Et als. The relationships of quantitatice nuclear morphology to molecular genetics alterations in the adenoma-carcinoma sequence of the luaje bowel. Am J. Pathol 1992; 141: 797-804.
9. MJ.Kejuchi; S Oka, H Saito. Computarized Nuclear Morphology ; a new morphology assements for advanced gastric adenocarcinoma. Am Surj. 1999; 229;58-61.
10. D.Korenaga. M Haraguchi, T Okamura et als. DNA Ploidy and tumor invasion in human gastric cancer histopathologic differentiation. Areh Surj. 1989; 124; 314-318.
11. R Damies. Ultraviolet radiation damage in DNA Biochem Soc. Trans. 1995;23;407-418.