

MÉTODOS DE MICROSCOPIA CUANTITATIVOS APLICADOS AL ESTUDIO DE LAS SECRECIONES VAGINALES (*)

1. CICLO MENSTRUAL NORMAL

Dr. R. GORDILLO DELBOY

RESUMEN

Se desarrolla un método de microscopía cuantitativo aplicado al estudio de las células exfoliadas de la secreción vaginal durante un ciclo menstrual normal.

El método se funda en la determinación de la relación núcleo cito-plasmática por comparación de módulos de superficie.

La técnica es simple. Los preparados se observan en fresco con el microscopio de contraste de fase. No se requiere de particular coloración. El conteo de los módulos de superficie se hace por medio de la cámara lúcida.

Se demuestra analíticamente que la relación núcleo citoplasmática es una medida de crecimiento y división celulares y que su variación define propiedades fundamentales del ciclo vaginal y sexual.

Se discuten las limitaciones del método.

I. CICLO MENSTRUAL NORMAL

La Citología Exfoliativa se confunde con el Método de Papanicolaou. Papanicolaou (13), (14), (15), (18) estableció las bases del moderno diagnóstico citológico y desarrolló un método de singular importancia en medicina (1), (3), (10), (11). Al Método de Papanicolaou, como a todos los métodos cualitativos le falta la exactitud propia de los métodos cuantitativos. Las células exfoliadas no exhiben particulares rasgos, caben las mayores confusiones.

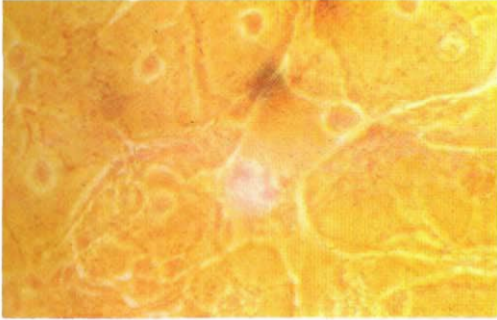
Reagan (16) empleando método de microscopía cuantitativos encuentra correspondencia numérica entre las lesiones pre-malignas y malignas del útero y prueba la importancia de la determinación cuantitativa de la relación núcleo citoplasmática en las células exfoliadas de la secreción vaginal.

El método planimétrico de Reagan no puede ser utilizado en el trabajo de rutina y la interpretación de los resulta-

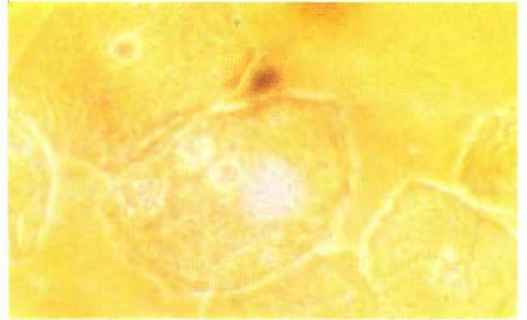
(*) Trabajo realizado en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Arzobispo Loayza, Lima, Perú.
Reconocido a los Drs. Javier Arias Stella y Uriel García Cáceres por las facilidades y ayuda proporcionadas.

MICROSCOPIO CONTRASTE DE FASE (MCF)

PREPARADOS EN FRESCO, MONTADOS EN ALBUMINA GLICERINADA AL 50%



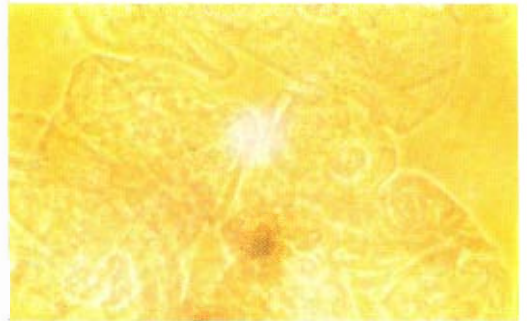
M. 1: 8avo. día



M. 2: 15avo. día



M. 3: 15avo. día



M. 4: 22avo. día



M. 5: Célula, Núcleo Extenso

CICLO MENSTRUAL NORMAL

Relación Núcleo, Citoplasmática en los diferentes días del ciclo menstrual

Cálculo de la Ecuación de la Curva

° Y : Índice modal encontrado (Ȳ) : media

° Y_c Índice modal calculado

y : desviación total

Y_c : desviación explicada

Y_s : desviación no explicada

Ecuación de la Curva

$$Y = 1.5698 + 0.1122X + 0.0679X^2$$

Demostración

$$sY = Na + .bs(X) + c s(X^2)$$

$$s(XY) = a s(X) + b s(X^2) + c s(X^3)$$

$$s(X^2Y) = a s(X^2) + b s(X^3) + c s(X^4)$$

$$54.39 = 17a + 408c$$

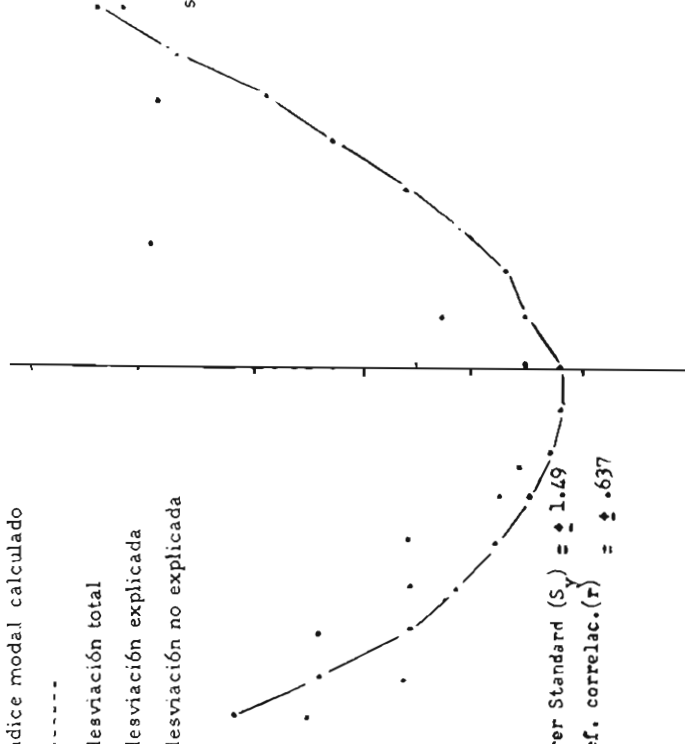
$$45.79 = 408b$$

$$1831.37 = 480a + 17544c$$

$$a = 1.5698$$

$$b = 0.1122$$

$$c = 0.0679$$



Error Standard (S_y) = ± 1.49

Coef. correlac.(r) = ± .637

-8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 desviaciones
6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 días ciclo

GRAFICA 1

2. Frecuencia

Las frecuencias de las células exfoliadas, agrupadas por módulos de superficie, se aproxima a la curva normal.

Media: 24.3 Mediana: 22.55 Modo: 20.32 Sesgo: 0.45 (Normal: 0) Kurtosis: 3.94 (Normal: 3.0)

CLASIFICACION

Células	Grupos	Relación núcleo citoplasmática
Inmaduras	I	11.53 ± 1.38
	II	7.65 ± 0.51
Transicionales	III	3.18 ± 0.22
Maduras	IV	1.71 ± 0.20
	V	1.86 ± 1.49

3. Distribución de los Grupos Celulares
(Cuadro 2)

Los Grupos I, IV y V, menos del 20%, no influyen mayormente en la relación núcleo citoplasmática (Im). II y III un poco más del 80%, entre los percentiles P₁₀ - P₉₀ siguen caminos inversos de distribución.

En el 11avo. día del ciclo hay 77.55% de III y 14.29% de II. Es probable que la ovulación ocurra entre el 11º y 14º días del ciclo menstrual.

4. Clasificación de las células exfoliadas de la secreción vaginal normal.

Sirve de base a la clasificación el valor numérico de la relación núcleo citoplasmática (Im). Se consideran tres tipos: Inmaduras. Transicionales. Maduras.

5. Variaciones de la relación núcleo citoplasmática (Im) en el ciclo menstrual normal (Cuad. 1 Graf. 1)

La variación de la relación núcleo citoplasmática es periódica y corresponde a una parábola con dos máximos 4.19 y 8.78 en el sexto y veintiún días del ciclo y un mínimo en el 14avo. día.

La ecuación de la curva (Graf. 1), por su forma, corresponde a la ecuación general de crecimiento: $y = ax^b$ demostrada en el crecimiento poblacional y otros sistemas biológicos (19).

V. DISCUSION

En 1892, O. Hertwig (8) considera la relación núcleo citoplasmática como medida del crecimiento y división celulares.

Cuadro 2. Ciclo Menstrual Normal

Grupo Cel.	mód. superf.	Nº	%	Yc	Yn	Im
I	-10	112	9.70	559.71 ± 78.08	23.37 ± 0.52	8.32
II	11-20	382	33.07	883.16 ± 13.59	30.58 ± 22.81	7.29
III	21-40	553	47.88	1673.04 ± 38.59	21.43 ± 3.18	3.17
IV	41-60	100	8.66	2245.14 ± 145.87	10.54 ± 4.16	1.71
V	61-80	8	0.69	3862.34 ± 169.45	32.46 ± 17.41	1.86
		1155	100	1375.02 ± 85.36	15.41 ± 0.56	4.18 ± 1.49

De Robertis (4) emplea la fórmula:

$$\text{RNC} = \text{Yn} \cdot 100 / \text{Yc} \cdot \text{Yn}$$

(Yn: área nuclear
Yc: área citoplasmática)

Reagan (16) aplica la fórmula de De Robertis-Newinski al estudio de las células exfoliadas en las lesiones premalignas y malignas del útero y encuentra que la relación núcleo citoplasmática guarda proporción con el grado de malignidad. El Método de Reagan marca una nueva etapa en la historia de la Citología Exfoliativa. Es la introducción de métodos cuantitativos y abre el camino de nueva e insospechada investigación en el estudio de las células exfoliadas.

Simplificamos el Método de Reagan. El cálculo de la relación núcleo citoplasmática la hacemos por comparación de módulos de superficie. Los resultados se expresan numericamente. No se consideran otras propiedades de las células: forma, color, tamaño, particulares detalles estructurales del núcleo y citoplasma. Los resultados a los que llegamos demuestran la importancia del método que se sigue.

La relación núcleo citoplasmática, por sí misma, es una medida de crecimiento. Las variaciones de esta relación en el ciclo menstrual normal quedan definidas por un polinomio de segundo grado (Gráfica 1), que por su forma, corresponde a las ecuaciones del crecimiento poblacional (19). Analíticamente se demuestra que la relación núcleo citoplasmática es una propiedad fundamental de las células.

Los valores numéricos de la relación núcleo citoplasmática oscilan entre dos máximos 4.18 y 6.24 y un mínimo de 1.62 que correspondería al 14avo. día

de la ovulación. La oscilación periódica de la relación núcleo citoplasmática probaría la existencia del ciclo vaginal y sexual y revelaría propiedades fundamentales del sistema.

Por último, la relación núcleo citoplasmática calculada en las células exfoliadas de procesos que se relacionan mutuamente, como sucede en las neoplasias epiteliales del cuello uterino, es la medida cuantitativa del cambio o transformación atípica. Reagan (16) encuentra:

Displasias: 16 ± 4.6 Carcinoma in situ: 31.9 ± 6.8 Carcinoma invasivo: 34.4 ± 6.8 .

En un estudio que hacemos (7) de 2,574 células de un caso probado de carcinoma in situ, encontramos:

Células anormales:

Maduras (displásicas)	: 12.2 - 24.1 (3%)
Transicionales	: 24.2 - 54.2 (7%)
Inmaduras o indiferenciadas	: 54 - 100 (85%)

Por último, terminamos esta discusión con algunas observaciones relativas a la técnica que se emplea.

Microscopio de Contraste de Fase (MCF)

Hasta 1950, el uso del MCF era una rareza (2). Algunos autores lo recomiendan en el examen de las secreciones vaginales (17), (20). El contraste celular es satisfactorio en las células normales de la secreción vaginal (M: 1-4); no ocurre lo propio cuando los núcleos son extensos, además del halo positivo (M: 5). Su uso es limitado.

Cámara Lúcida

La cámara lúcida tiene la ventaja sobre el procedimiento planimétrico de que puede ser empleada en el trabajo de rutina y disponer, en todo momento, de la prueba objetiva de la observación. El conteaje de los módulos de superficie es laborioso y demanda tiempo, hasta que este aspecto de la técnica no se mejore, el empleo de la cámara lúcida, igualmente tiene que ser limitado.

VI. RESUMEN - CONCLUSIONES

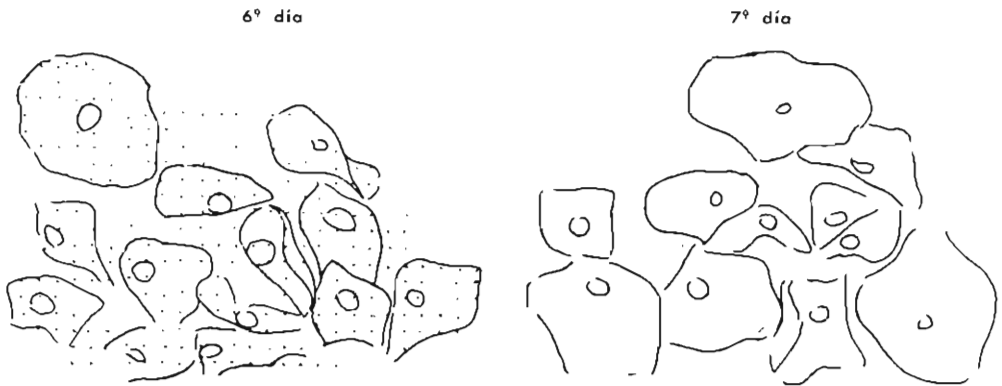
1. Se desarrolla un método cuantitativo que aplicamos al estudio de las células exfoliadas de la secreción vaginal durante el ciclo menstrual normal.
2. El método se funda y considera que la relación núcleo citoplasmática, determinada cuantitativamente es una propiedad fundamental de la célula, siempre presente y observable.
3. El método no es morfológico. Carecen de significado la forma, el tamaño, color, particulares detalles estructurales, de las células, etc. Los resultados se expresan numéricamente y pueden ser verificados.
4. La técnica es simple. Los preparados se observan en fresco, montados con albúmina glicerinada al 50%, directamente con el microscopio de contraste de fase. La relación núcleo citoplasmática se calcula por comparación de módulos de superficie nucleares y citoplasmáticos.
5. Se demuestra analíticamente que la relación núcleo citoplasmática es una medida de crecimiento y división celulares y que su variación corresponde y define propiedades fundamentales del ciclo sexual y vaginal.
6. Se presenta una clasificación de las células exfoliadas.
7. Se discuten las limitaciones del método.

(Siguen cuadros en las siguientes páginas)

CITOMORFOMETRIA

Secreción Vaginal: Ciclo Menstrual Normal

$$Y = (56.84) x - (38.59)$$



6º DIA

grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	23	11.27	179	21	403.63	13.13	13.25
II	82	40.20	1286	73	852.66	12.00	6.02
III	84	41.18	2337	76	1542.70	12.57	3.34
IV	15	7.35	725	12	2708.49	6.88	1.68
V							
	204	100	4527	182	1222.69	12	4.18

7º DIA

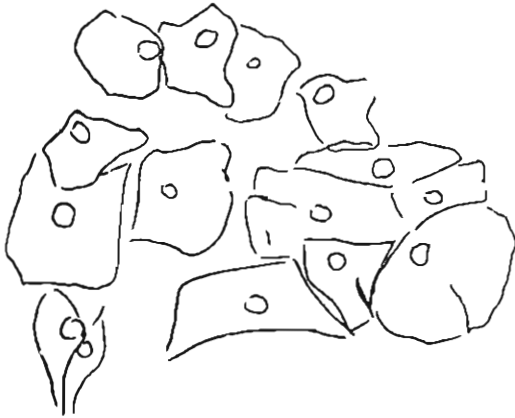
grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	3	3.70	24	3	416.13	18.25	14.19
II	19	23.46	302	17	864.60	12.00	5.96
III	45	55.56	1340	37	1654.11	8.02	2.84
IV	13	16.05	659	12	2842.63	13.70	1.85
V	1	1.23	73	1	4110.73	18.25	1.39
	81	100	2398	70	1643.87	10.29	3.01

CITOMORFOMETRIA

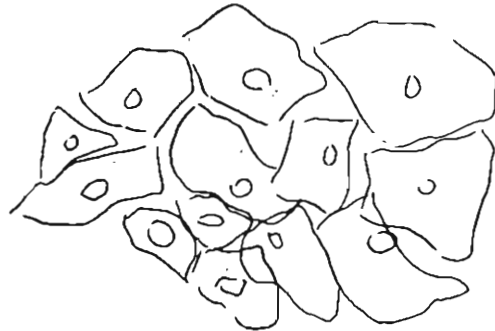
Secreción Vaginal: Ciclo Menstrual Normal

$$Y = (56.84) x - (38.59)$$

8º día



9º día



8º DIA

grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	3	8.11	24	4	416.13	37.01	20.00
II	12	32.43	191	22	866.30	65.43	13.02
III	17	45.95	531	17	1737.09	18.25	3.31
IV	4	10.81	207	4	2902.88	18.25	1.97
V	1	2.70	73	1	4110.73	18.25	1.39
	37	100	1026	48	1537.58	35.30	4.91

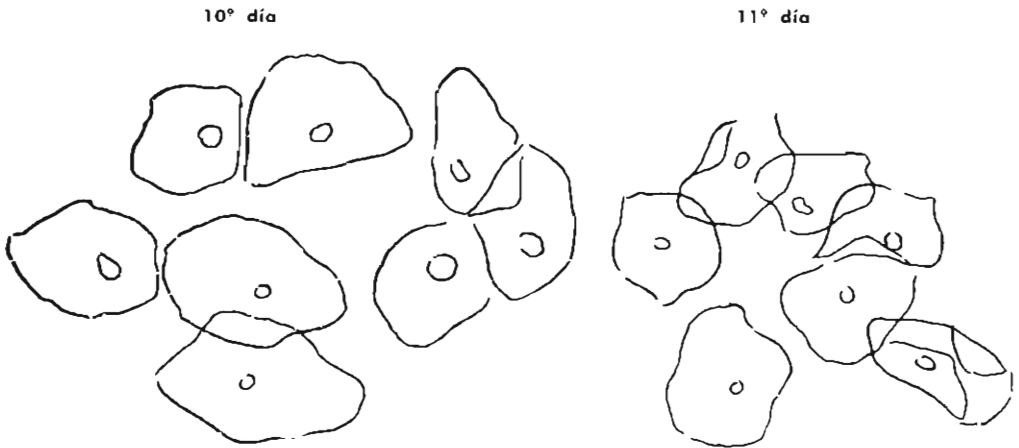
9º DIA

grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	2	4.00	16		75.09		
II	11	22.00	168	10	829.36	13.13	6.33
III	24	48.00	742	25	1718.90	20.52	3.49
IV	10	20.00	515	7	2888.67	1.20	1.38
V	3	6.00	204	6	3826.53	75.09	3.03
	50	100	1645	48	1831.45	15.98	3.01

CITOMORFOMETRÍA

Secreción Vaginal: Ciclo Menstrual Normal

$$Y = (56.84) x - (38.59)$$



10º DIA

grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	4	5.48	32	2	416.13		6.67
II	20	27.50	325	17	885.06	9.72	5.52
III	40	54.79	1155	31	1602.95	5.75	2.76
IV	9	12.23	392	7	2437.36	5.75	1.82
V	—	—	—	—	—	—	—
	73	100	1904	57	1443.80	5.75	3.09

11º DIA

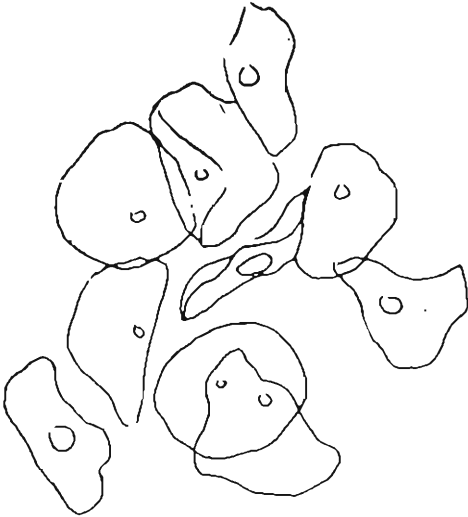
grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	1	2.04	8		416.13		
II	7	14.29	121	4	979.17		
III	38	77.55	1049	19	1530.76		1.84
IV	3	6.12	134	3	2511.82	18.25	2.29
V	—	—	—	—	—	—	—
	49	100	1312	26	1483.59		2.02

CITOMORFOMETRIA

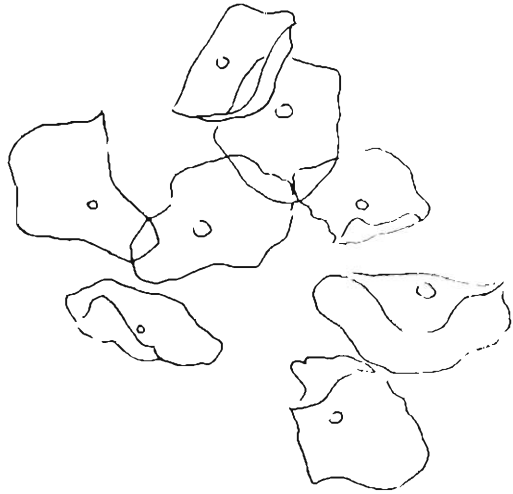
Secreción Vaginal: Ciclo Menstrual Normal

$$Y = (56.84) x - (38.59)$$

13º día



14º día



13º DIA

grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	1	1.05	8		416.13		
II	30	31.58	485	26	880.51	10.86	5.66
III	51	53.68	1493	42	1625.12	8.02	2.89
IV	11	11.58	508	9	2586.28	8.02	1.80
V	2	2.11	136	2	3826.53	18.25	1.49
	95	100	2630	79	1534.77	8.59	3.10

14º DIA

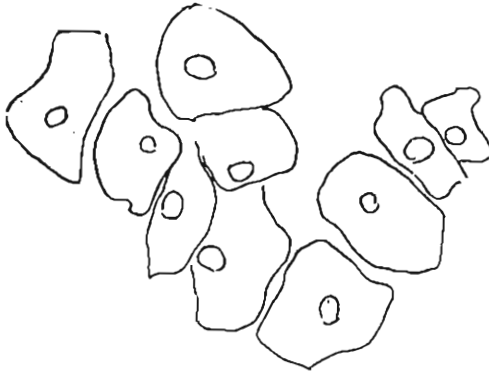
grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I							
II	4	4.00	67				
III	67	67.00	2066	37	1693.89		
IV	28	28.00	1309	19	2618.68	0.06	
V	1	1.00	63		3542.33		
	100	100	3505	56	1953.65		1.62

CITOMORFOMETRIA

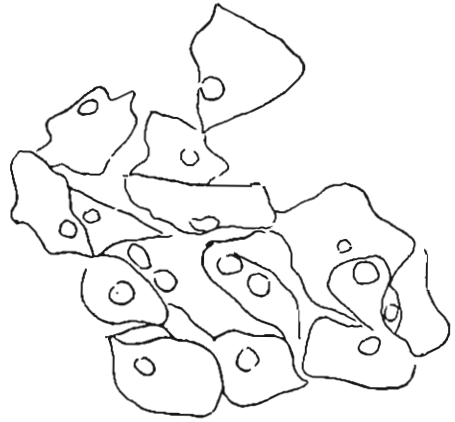
Secreción Vaginal: Ciclo Menstrual Normal

$$Y = (56.84) x - (38.59)$$

15° día



17° día



15° DIA

grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	2	2.00	16	1	416.13		6.25
II	31	31.00	503	25	883.92	7.45	5.23
III	65	65.00	17.35	34	1478.47		2.00
IV	2	2.00	86	3	2405.53	46.67	3.61
V							
	100	100	2340	63	1291.47	3.21	2.77

17° DIA

grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	20	25.97	160		416.13		
II	23	29.87	374	42	885.63	65.43	12.65
III	32	41.56	396	43	1623.98	37.58	4.82
IV	2	2.60	96	2	2689.73	18.25	2.13
V							
	77	100	1566	87	1117.54	25.64	5.88

CITOMORFOMETRÍA

Secreción Vaginal: Ciclo Menstrual Normal

$$Y = (56.84) x - (38.59)$$

20º día



21º día



20º DIA

grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	27	29.03	516	35	1047.62	35.30	7.28
II	54	58.06	1057	57	1073.77	56.66	5.70
III	12	12.90	536	23	2500.45	70.54	4.48
IV							
V							
	93	99.99	2109	115	1250.54	31.89	5.77

21º DIA

grup. cel.	n	%	np	np'	Yc	Yn	Im
I	24	25.00	192	24	416.13	18.25	14.29
II	45	46.88	650	62	782.18	39.85	10.54
III	24	25.00	667	45	1540.99	68.27	7.23
IV	3	3.13	139	2	2594.81		1.46
V							
	96	100.01	1648	133	937.35	40.42	8.78

CITOMORFOMETRIA

Secreción Vaginal: Ciclo Menstrual Normal

$$Y = (56.84) x - (38.59)$$



22º DIA

grup. cel.	n	%	np	np'	p	p'	Yc	Yn	Ar	Im
I	2	2.00	16	2	8.00	1.00	416.13	18.25	4.59	14.29
II	44	44.00	637	64	16.75	1.45	785.45	43.83	5.92	11.17
III	54	54.00	1462	64	27.07	1.19	1500.07	29.05	1.97	4.58
IV										
V										
	100	100	2215	130	22.15	1.3	1220.42	35.30	2.98	6.24

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1) ALLEN T.: The Oestrus Cycle in the Mouse. Amer. J. Anat. 30: 297. 1922.
- 2) BARER, R.: Phase Contrast and Interference Microscopy in Cytology. Physical Techniques in Biological Research. Second Edition. Edited by Arthur W. Polister. Vol. IIIA.
- 3) CAMERON, R.: The Cancer Cell. Cytology and Cell Physiology. Edited by Bourne, G. H. Third Edition Academic Press. New York. 1964 (pp. 697-712).
- 4) DE ROBERTIS, E. D. P., NOWINSKI, W. W., and SAEZ, F. A.: Biología Celular 8va. Edición "El Ateneo". Buenos Aires. 1971.
- 5) GARCIA-CACERES, U. and col.: Studies of Tubular Alterations in Diffuse Renal Disease. III. Quantitative Evaluation of Kidner of Acute Tubular Necrosis. Reprinted from The Johns Hopkins Medical Journal. Vol. 121, Nº 5, pp. 333-342, November, 1967. Printed in USA.
- 6) GLAGOLEFF, A. A.: Citado por August Henning y col. "Microscopic Volume Determination and Probability" Laboratory Investigation. 2: 460. 1963.
- 7) GORDILLO DELBOY, R.: (Inédito) 1976.
- 8) HERTWING, O.: (1892) "Die Zelle und das Gewebe". Citado por De Robertis, E. D. R.,

- Nowinski, W. W. y Saez, F. A. *Biología Celular* (8va. Edición). Lib. "El Ateneo". Buenos Aires. 1971. (pág. 9).
- 9) HOWLAND, J. L.: *Cell Physiology. Part IV. Cell growth and genetic regulation.* The Macmillan Company. New York. 1973. (pp. 345-348).
- 10) LONG, J. A., and EVANS, H.: *The Oestrus Cycle in the Rat and Its Associated Phenomena.* Berkeley, California Univ. California Press. 1922.
- 11) NEEF de, J. C.: *Clinical Endocrine Cytology.* Hoeber Medical División. Horper & Row, Pub., New York. 1965.
- 12) OSTERBERG, H.: *Phase and Interference Microscopy. Physical Techniques in Biological Vol. I. Optical Techniques,* Edited by Gerarld Oester and Arthur W. Pollister. Academic Press Inc., Publishers New York. 1965.
- 13) PAPANICOLAOU, G. N.: *The Sexual Cycle in the Human Female as Revealed by Vaginal Smears.* Am. J. Anat. 52: 519. 1933.
- 14) PAPANICOLAOU, G. N.: *A New Procedure for Staining Vaginal Smears.* Science. 95: 438-439, April 24, 1942.
- 15) PAPANICOLAOU, G. N., and TRAUT, H.: *Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear.* New York. The Commonwealth Fund. 1943.
- 16) REAGAN, J. W.: *Cellular Manifestations of Uterine Carcinogenesis. The Uterus.* Edited by Norris, H. J. The Williams and Wilkins Co. 1973.
- 17) RUNGE y col. y ZUNZER: Citado por Wied, G. L. *Phase Contrast Microscopy, Office Technique for Prescreening of Cytological Vaginal Smears.* Am. J. Obst. and Gyn. 71: 806, 1956.
- 18) STOCKARD, C. R., and PAPANICOLAOU, G. N.: *The Existence of Oestrus Cycle in the Guinea Pig - With a Study of Its Histological and Physiological Changes.*
- 19) WATERMAN, T. H.: *The Problem. Theoretical and Mathematical Biology.* Edited by H. J. Morowitz and T. H. Waterman. Blaisdell Publishing Company. 1965.
- 20) WIED, G. L.: *Phase-Contrast Microscopy, Office Technique for Prescreening of Cytologic Vaginal Smears.* Am. J. Obst. and Gyn. 71: 806, 1956.