

1.2. EL CICLO CELULAR Y SU ESTUDIO A TRAVÉS DE LA CITOMETRÍA.

1.2.1. EL CICLO CELULAR

Durante su vida, las células eucariotas tanto normales como tumorales ejecutan un ordenado conjunto de fases denominado “*ciclo celular*” en el que cada nuevo paso, requiere que el paso previo se haya completado perfectamente. El objetivo final del ciclo celular es la división celular preservando con fidelidad la información genética contenida en la célula madre, de forma que copias cromosómicas idénticas sean distribuidas a las células hijas durante la mitosis¹³⁷. Esta compleja maquinaria se divide en cuatro fases

- *Fase G0*: o fase de reposo celular.
- *Fase G1*: momento en que las células se preparan para sintetizar ADN,
- *Fase S*: o período de síntesis de ADN,
- *Fase G2*: se realizan las preparaciones necesarias para la división celular,
- *Fase M*: se produce la división celular.

Las células que no se dividen activamente acaban diferenciándose siendo incapaces de reentrar en el ciclo celular permaneciendo en estado de reposo.

Imbricados entre las fases G1-S y G2-M se encuentran los llamados “*puntos de restricción*”, cruciales a la hora de decidir la entrada de la célula en la siguiente fase. Se trata de ejes bioquímicos encargados de controlar el orden de los pasos a ejecutar y el tiempo de transición entre ellos dentro del ciclo celular, asegurando que los eventos críticos tales como, la replicación del ADN y la segregación cromosómica, se realicen de forma rigurosa vigilando en todo momento la integridad del material genético. Cuando se detecta un daño en el ADN los puntos de restricción responden frenando el ciclo celular e induciendo la transcripción de genes que facilitarán la reparación del ADN dañado. La pérdida o mutación de los genes que integran los puntos de restricción produce “*inestabilidad genómica*” que llevará a la transformación de la célula normal en una célula cancerosa^{138,139}.

Así, el punto de restricción localizado entre las fases G1 y S vela y vigila para que el

ADN que se sintetice lo haga correctamente, mientras que el punto de restricción localizado en la fase G2 vigila que el material genético se reparta equitativa y fidedignamente a las células hijas durante la fase M.

Las fases del ciclo celular se agrupan en dos más genéricas denominadas:

- *Interfase*: comprende las fase G1, S y G2
- *Mitosis*: fase M.

La introducción de métodos citoquímicos, como la coloración de Feulgen, seguida de la cuantificación del ADN por citofotometría, mostraron los primeros indicios de que la duplicación del ADN ocurría durante la interfase. Las autoradiografías con timidina marcada radioactivamente fueron fundamentales para demostrar el momento exacto en el que se producía la duplicación del ADN, la fase S. Durante G2, la célula contiene el doble de cantidad de ADN (4C) que el presente en la célula diploide original (2C). Tras la mitosis las células hijas tienen un contenido de ADN equivalente a 2C.

La duración del ciclo celular varía en función del tipo celular. En general, los períodos S, G2 y la mitosis son los más constantes siendo G1 el período más variable pues está en relación con la condición fisiológica. La duración de la fase G1 es variable pudiendo durar días, meses o años.

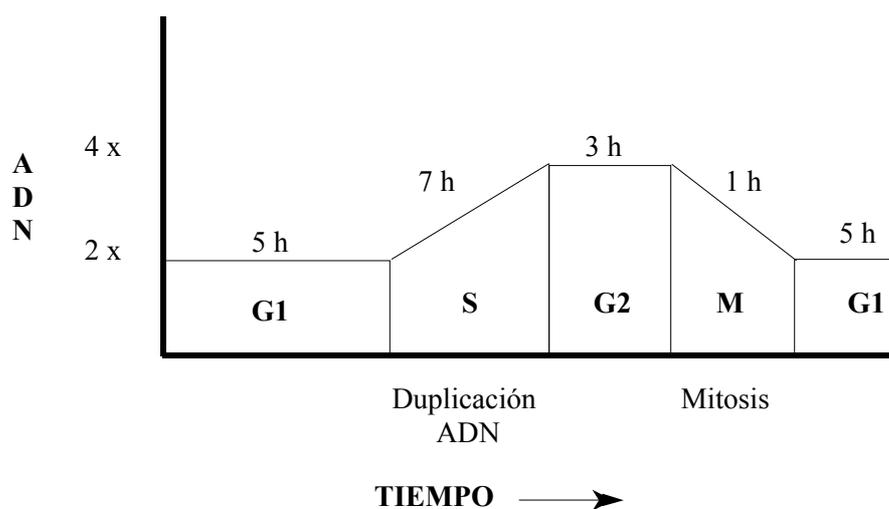


Figura 8.- Duración del ciclo celular.

Los tejidos que normalmente no se dividen, como las neuronas o el músculo esquelético, o que se dividen poco como los linfocitos, se hallan en período G1 y contienen una masa de ADN igual a $2C$ ¹⁴⁰.

1.2.2. LA PLOÍDIA SEGÚN TÉCNICAS CITOGENÉTICAS Y CITOMÉTRICAS.

El ADN es el principal componente genético de la célula y el que alberga toda la información codificada que será transmitida de una célula a otra.

Los núcleos de un individuo tienen una cantidad constante de ADN denominado, valor *c*. Este hallazgo constituyó uno de los descubrimientos más importantes de la biología celular y sugirió que el ADN contiene la información genética, así como, que durante la diferenciación de los tejidos somáticos no hay pérdida de información.

Todas las células de un organismo contienen la misma cantidad de ADN ó $2c$, siempre que sean diploides. Los gametos son haploides y tienen la mitad de contenido de ADN ($1c$) pero algunos tejidos como por ejemplo el hígado, contienen células poliploides con núcleos que contienen más cantidad de ADN, como son células tetraploides con contenido $4c$ y células octoploides con contenido $8c$. El funcionamiento normal del sistema genético se mantiene por la constancia del material hereditario formado por cromosomas. El núcleo de una célula diploide de la especie humana contiene 44 autosomas y 2 cromosomas sexuales, expresándose la masa del núcleo como $2c$ y su número de cromosomas característico como $2n$. Al grupo de características que permiten identificar al conjunto cromosómico se le denomina *cariotipo*¹⁴⁰.

Los cromosomas pueden sufrir alteraciones numéricas y/o estructurales. Las alteraciones numéricas pueden ser estudiadas por medio de técnicas citogenéticas y citométricas, ahora bien, las alteraciones estructurales no son accesibles a este tipo de estudios.

Por medio de análisis citogenético, se pueden detectar las alteraciones numéricas del cariotipo, observando los cromosomas en su estado de condensación o metafase en el que los

cambios producidos pueden ser fundamentalmente de dos tipos:

- *Euploides*: el número de cromosomas se mantiene equilibrado. Estructuralmente podrían traducir traslaciones de porciones de alelos que no modifican el número de cromosomas.
- *Aneuploides*: existe ganancia o pérdida de cromosomas, como por ejemplo, en las disyunciones en las que se produce un fallo en la separación de los cromosomas.

Los resultados obtenidos por medio de técnicas citométricas con respecto al contenido de ADN nuclear varían de los obtenidos por medio de estudios citogenéticos, por lo que se ha acordado conservar el término “*aneuploidía*” para las anomalías detectadas en el cariotipo por estudio citogenético y el de “*ADN aneuploide*” se reserva para cantidades anómalas de ADN detectadas por estudio citométrico¹⁴¹.

La incidencia de tumores aneuploides detectados por técnicas citométricas es menor que los detectados por análisis citogenético debido al hecho de que la citometría no detecta anomalías compensadas numéricamente. Esto es por ejemplo, lo que ocurre en las translocaciones cromosómicas y en las monosomías o en las trisomías únicas, en ellas no existe pérdida ni ganancia de cromosomas. En estos casos, el contenido de ADN implicado será como máximo un 4% del contenido total del ADN nuclear, siendo imposible la detección de esta anomalía por medio de citometría tal como se explicará más adelante. Las técnicas citogenéticas son más sensibles para detectar anomalías cromosómicas.

No obstante, lo global de la información que aportan las técnicas citométricas sobre el contenido de ADN, existe cada vez una evidencia más consistente acerca de la relación entre la aneuploidía del ADN y la agresividad de los tumores sólidos.

1.2.3. EL ADN CITOMÉTRICO

Las poblaciones celulares con ADN aneuploide pueden mostrar cantidades variables de ADN. El grado de variación se expresa mediante el *índice de ADN* (IADN) definido como la relación entre el contenido medio de ADN de la población celular problema y el contenido medio de ADN de la población patrón (2c), suponiendo que ambas poblaciones se encuentran

en la fase de reposo. Así, poblaciones con cariotipo diploide tienen un IADN igual a uno, mientras que a poblaciones aneuploides les corresponderá un IADN mayor o menor que uno¹⁴¹.

Citométricamente, la ploidía se expresa siempre en función de la cantidad de ADN (IADN) utilizándose la siguiente terminología:

- *ADN hipodiploide*: la aneuploidía es debida a la pérdida de ADN nuclear con respecto al ADN de una célula diploide (IADN < 1).
- *ADN diploide*: la cantidad de ADN es igual al de la población patrón (IADN = 1),
- *ADN hiperdiploide*: la aneuploidía se debe a un aumento del ADN nuclear con respecto al que corresponde a una población celular diploide (IADN > 1) pero manteniéndose el contenido en ADN por debajo de 4c,
- *ADN tetraploide*: el contenido de ADN nuclear es el doble que el de la población patrón (IADN = 2),
- *ADN hipertetraploide*: el contenido en ADN celular supera al de una población tetraploide (IADN > 2).

Teóricamente, todas las mediciones realizadas por medio de técnicas citométricas deberían dar un resultado idéntico para cada núcleo celular de poblaciones en reposo (G0). Sin embargo, en la práctica esto no es así, debido a la existencia de factores técnicos relacionados con los equipos de medición y a factores dependientes de las muestras y de su preparación^{142,143,144}.

Se ha acordado que esta variabilidad puede expresarse mediante el *coeficiente de varianza* (CV) definido como la relación entre la desviación estándar y la media de los valores obtenidos para una población celular diploide o población patrón en fase G0, expresado en tanto por ciento¹⁴⁵.

El coeficiente de varianza valora la resolución de la técnica utilizada durante el proceso de cuantificación. Por ejemplo, un CV = 2% significa que la capacidad de resolución

de la técnica durante la cuantificación es del 4%. Por consiguiente, un CV igual al 4% implica que a una población celular con valores de IADN que oscilen entre 0.96 y 1.04 le será asignado un IADN = 1.

Las técnicas citométricas dan información sobre el reparto cuantitativo del ADN nuclear total de una población celular proliferante, a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. Por medio de estas técnicas y en función del contenido de ADN nuclear se puede saber el porcentaje exacto de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular (G0-G1, S y G2-M). Por lo tanto, permiten realizar un análisis del ciclo celular obteniéndose histogramas que lo representan gráficamente¹⁴⁶. El pico más alto obtenido corresponde a las células en fase G0-G1 y el pico más bajo muestra las células en fase G2-M. Las células representadas entre ambos picos están en fase S.

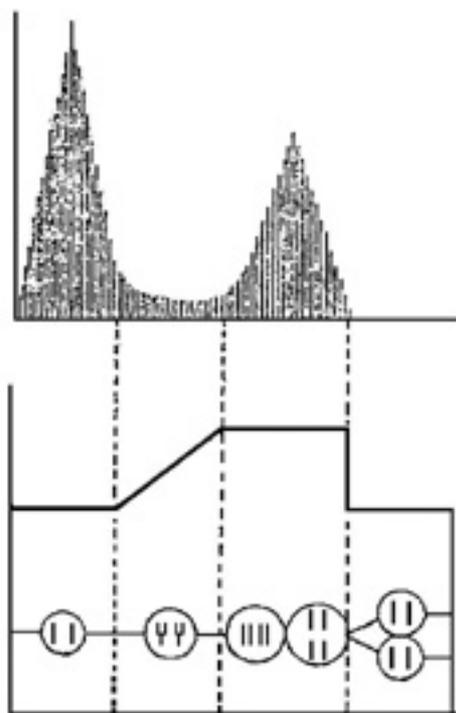


Figura 9.- Ciclo celular en función del contenido en ADN nuclear.

Por otro lado, la citometría nos permite obtener datos como el grado de ploidía y la actividad proliferativa celular los cuales constituyen dos importantes factores pronósticos tumorales.

Aunque esta técnica permite una correcta valoración del ciclo celular en poblaciones normales, existen ciertas limitaciones a la hora de hacer la misma determinación en los tejidos tumorales. Los tumores malignos presentan frecuentemente una importante mezcla de poblaciones celulares en distintas fases del ciclo que se superponen en los histogramas por lo que no permitiría el análisis selectivo y estricto del ciclo celular de cada una de las diferentes poblaciones presentes en la muestra.

Otro problema que se nos plantea es que ofrece una visión estática del ciclo celular siendo imposible por ejemplo, saber si las células identificadas como células en fase S están sintetizando ADN o si por el contrario, se trata de núcleos con ADN anómalo o incluso artefactos como dobletes o triplete.

Actualmente, el uso combinado de técnicas inmunohistoquímicas para determinar la expresión de proteínas reguladoras, junto con la cuantificación del ADN permiten efectuar estudios dinámicos del ciclo celular. El uso de anticuerpos monoclonales contra los antígenos Ki 67, PCNA, ciclinas, ciclinas-dependientes de quinasas y otros, seguido de la cuantificación de ADN permiten identificar el porcentaje de células distribuidas durante las distintas fases del ciclo celular. Ambos antígenos, Ki 67 y PCNA, son débilmente positivos durante la fase G1, claramente positivos durante la fase S y empiezan a disminuir su positividad durante la fase G2^{147,148}. Otro marcadores como la estatina (Statin) permite identificar células en reposo (G0) ya que las células en reposo son statin positivas mientras que las células en fase G1 son statin negativas. La determinación de complejos ciclina-quinasa dependiente de ciclina como por ejemplo, cdc2-ciclina B está vinculada estrechamente con el inicio de la mitosis¹⁴⁹ (Figura 10).

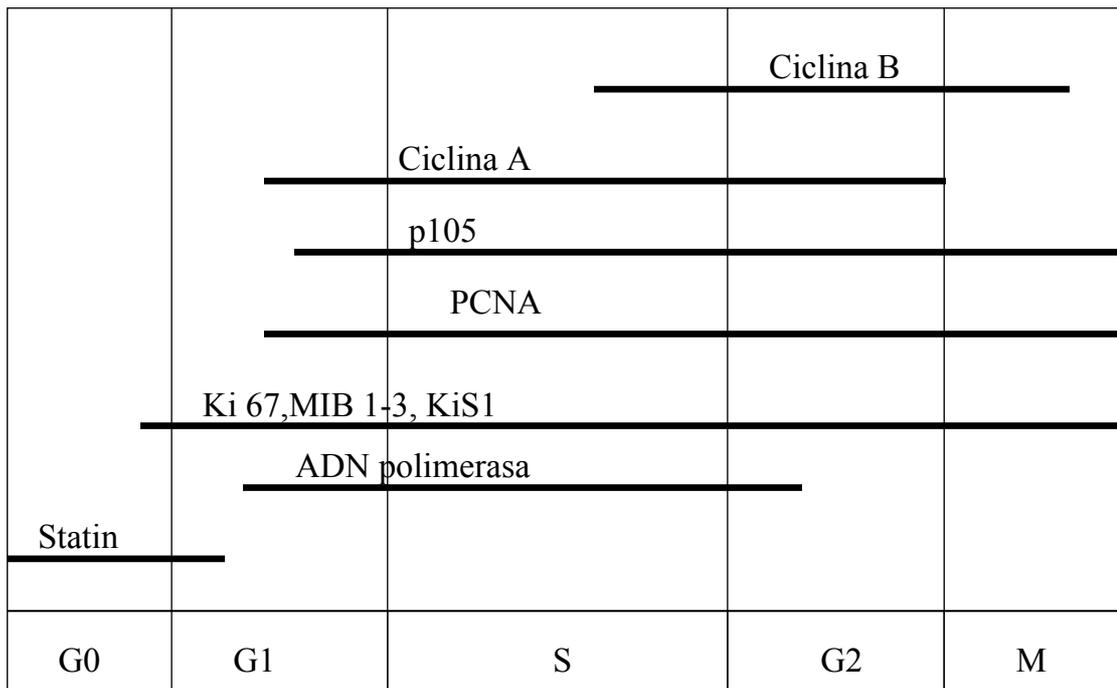


Figura 10.- Expresión de proteínas según la fase del ciclo celular.

1.3. TÉCNICAS CITOMÉTRICAS: CITOMETRÍA DE FLUJO Y CITOMETRÍA DE IMAGEN.

La cuantificación del ADN, tanto en citología como en histología, se ha convertido gracias a los avances tecnológicos, en un procedimiento simple y rutinario en muchos laboratorios de anatomía patológica. Estas técnicas descritas hace más de dos décadas ofrecen una importante información diagnóstica y pronóstica complementaria^{150,151}.

Hoy en día se dispone fundamentalmente de dos técnicas citométricas:

- Citometría de flujo y
- Citometría de imagen, de fluorescencia y de absorción.

En nuestro estudio hemos utilizado la *citometría de imagen por absorción de luz*, razón por la cual, cuando nombremos citometría de imagen nos referiremos únicamente a este tipo de técnica.

La *citometría de flujo* se basa en hacer circular una suspensión celular frente a unos haces de luz monocromática. Estas suspensiones de células o núcleos se tiñen previamente con un colorante fluorescente específico para la sustancia que se quiere cuantificar (fluorocromo).

La suspensión se hace fluir por un tubo capilar con la finalidad de que los objetos pasen uno a uno mientras el haz de luz generado por láser, incide perpendicularmente a la dirección del flujo.

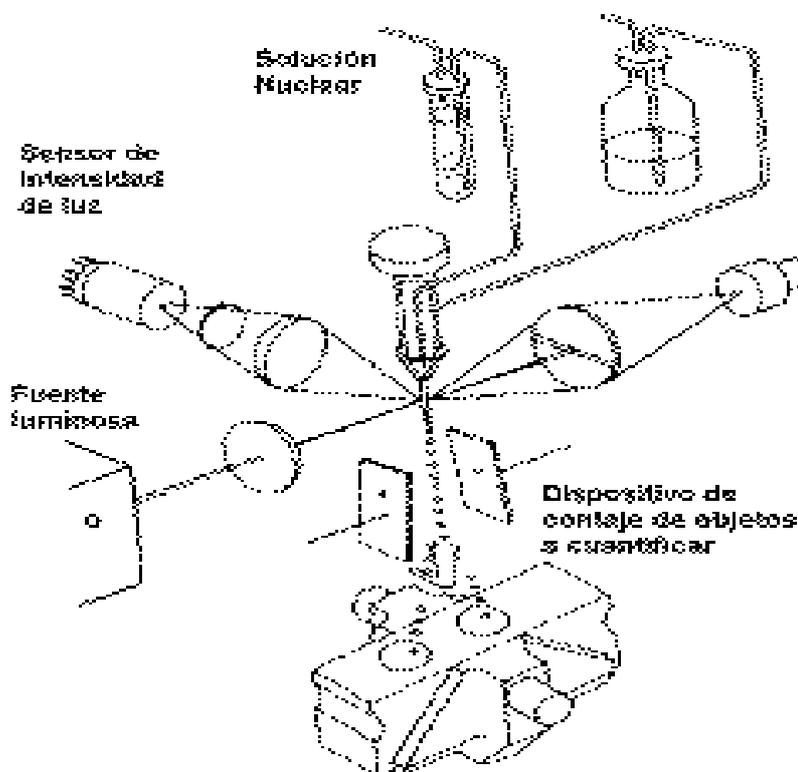


Figura 11.- Citómetro de flujo.

Al incidir la luz sobre la suspensión se genera una radiación fluorescente que se puede cuantificar siendo el valor de la intensidad lumínica directamente proporcional a la cantidad de ADN¹⁵².

En la *citometría de imagen* existen dos grupos de técnicas según el principio físico en el que se fundamentan. Una de estas técnicas se basa en la emisión de fluorescencia al estimularse el núcleo marcado con fluorocromo mediante luz ultravioleta. La otra se basa en la absorción de luz incidente sobre componentes celulares teñidos con sustancias cromogénicas. En nuestro estudios hemos utilizado la técnica de citometría de imagen por absorción de luz.

La citometría de imagen se basa en la propiedad de absorción de luz que tienen las sustancias. Cuando una fuente lumínica incide sobre una sustancia, ésta absorbe una determinada intensidad de luz de una longitud de onda específica (). La intensidad de luz absorbida es proporcional a la cantidad de sustancia presente y viene expresada por la ley de

Lambert-Beer que más tarde se expondrá.

Las muestras, improntas tisulares y/o suspensiones nucleares que se analizan, se tiñen previamente con la tinción de Feulgen cuya característica es la de unirse específica y estequiométricamente al ADN. Al final, el análisis de imagen se basará en relacionar la absorción luminosa del reactivo con la cantidad de ADN al que está unido^{153,154}.

Los sistemas de análisis de imagen se componen de los siguientes equipos:

- un equipo con un sistema de iluminación que crea imágenes,
- una cámara que captura estas imágenes y,
- un ordenador con un programa informático que procesa las imágenes y analiza los datos obtenidos de ellas. En el punto 1.5 se describe detalladamente el proceso que aplican estos sistemas.

Las ventajas y desventajas de cada técnica son la consecuencia de la diferente tecnología utilizada en cada caso^{155,156} (Tabla 2 y Tabla 3).

1.3.1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.

Tabla 2.- Ventajas y desventajas de la Citometría de Flujo

CITOMETRIA DE FLUJO
<p style="text-align: center;"><u>Ventajas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Analiza de forma muy rápida un elevado número de células (>100.000 células/minuto). - Ofrece exactitud estadística debido al elevado número de células valoradas y de los datos disponibles. - La tinción de las células en suspensión es simple y reproducible. - La técnica tiene una elevada resolución dado que la fluorescencia aporta más sensibilidad que la absorción a las técnicas cuantitativas. - Analiza tanto muestras in vivo como in vitro. <p style="text-align: center;"><u>Desventajas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - No es interactivo ni selectivo, no permitiendo la identificación de células o núcleos mediante citodiagnóstico. - El histograma obtenido no representa únicamente las características de las células tumorales, sino que se suman las de los otros componentes no tumorales. - Es insensible para células anómalas escasamente representadas en la muestra (<1%), dado que los picos que estas discretas poblaciones representan son pequeños y suelen quedar enmascarados por artefactos dobles o tripletes de núcleos. - No permite realizar análisis de textura cromatínica. - Es poco exacto calculando parámetros morfométricos. - No permite el análisis de cortes histológicos completos.

1.3.2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA CITOMETRÍA DE IMAGEN POR ABSORCIÓN.

Tabla 3.- Ventajas y desventajas de la Citometría de Imagen

CITOMETRIA DE IMAGEN
<p style="text-align: center;"><u>Ventajas</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Los equipos modernos son rápidos. <p>Permiten la visualización de detalles citológicos de la muestra pudiendo identificar y elegir los núcleos tumorales.</p>

- Se pueden eliminar artefactos mediante programas computarizados o interviniendo interactivamente.
- Detecta células anómalas poco representadas (1 célula entre 10.000).
- El análisis puede efectuarse sobre cortes histológicos si la muestra lo requiere.
- Permite el correcto análisis de la textura cromatínica.
- Correcta cuantificación de parámetros morfológicos.
- Las muestras no representativas pueden ser rechazadas.
- El análisis puede repetirse en el mismo laboratorio o en otro.

Desventajas

- Es más lento que la citometría de flujo (< 5.000 núcleos/ minuto con los equipos más automatizados).
 - Requiere extremo cuidado con respecto a la preparación de las muestras (fijación y tinción).
 - La sensibilidad de la técnica para la cuantificación del ADN es inferior a la de la citometría de flujo.
 - La resolución es más baja que por citometría de flujo.
-

A pesar de estas diferencias numerosos estudios demuestran, que los resultados obtenidos por medio de una técnica y de otra son totalmente superponibles con una correlación entre las mediciones de ploidía cercano al 93%. Cuando se correlaciona únicamente medición de aneuploidía la concordancia es del 92.59% mientras que disminuye a un 58.3% cuando se valora conjuntamente aneuploidía e índice de ADN^{157,158,159,160}.

Koss et al. en 1989¹⁶⁰ realizaron un estudio en el que encontraron, que los patrones de aneuploidía identificados por medio de citometría de imagen, que la citometría de flujo no había sido capaz de detectar, fueron predictivos de recidiva tumoral. Aproximadamente un 7.4% de poblaciones aneuploides no son detectadas por la citometría de flujo.

Estas discrepancias entre citometría de flujo y de imagen se atribuyen a la heterogeneidad de los tumores, haciéndose más evidente en aquellas muestras que presentan un escaso número de células aneuploides entre una gran cantidad de células diploides. En estos casos, la citometría de imagen presenta ventajas frente a la de flujo, gracias a su capacidad para discriminar entre un tipo de células y otro. En la citometría de flujo las

poblaciones aneuploides pueden verse enmascaradas por la presencia de células no tumorales, inflamatorias o células diploides^{159,217}

En general, la citometría de imagen tiene mayor sensibilidad que la de flujo a la hora de detectar clones celulares pequeños y aneuploides pero su principal limitación está en su bajo poder para discriminar entre picos peridiploides, debido en gran parte a los altos coeficientes de varianza que se obtiene en las muestras parafinadas.

1.4. FUNDAMENTOS FÍSICOS DE LA CITOMETRÍA DE IMAGEN. LEY DE LAMBERT-BEER.

Tal como se especificó previamente, la citometría de imagen se fundamenta en la absorción de luz de las sustancias.

Este fenómeno está regido por la *ley de Lambert-Beer*¹⁶¹, la cual expresa que al incidir una fuente luminosa sobre una sustancia, la relación existente entre la intensidad de luz incidente y la transmitida es proporcional a la cantidad de sustancia. La expresión matemática de esta ley es:

$$\log \frac{I_0}{I} = A = abc$$

I_0 = intensidad de luz incidente

I = intensidad de luz transmitida

b = espesor atravesado por la radiación lumínica

c = concentración de partículas absorbentes

a = absorbilidad (constante de proporcionalidad)

A = absorción

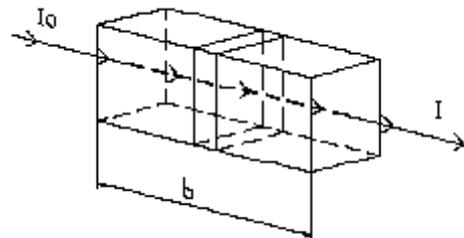


Figura 12.- Absorción de radiación.

En la práctica no se trabaja con los valores de absorbilidad ni de espesor atravesado, sino que se condensa todo en un factor de proporcionalidad que se determina antes de la realización de cada serie de cuantificaciones. La expresión matemática de la ley queda de la siguiente forma:

$$\log \frac{I_0}{I} = \log I_0 - \log I = \alpha c$$

$$\log I = -\alpha c + \log I_0$$

$I_0 =$ intensidad luz incidente

$I =$ intensidad luz transmitida

$c =$ concentración de partículas
absorbentes

$\alpha =$ factor de proporcionalidad

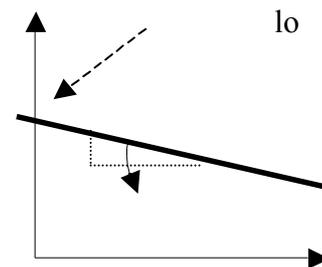


Figura 13.- Ley de Lambert-Beer

Esta expresión es la ecuación de una recta cuya pendiente y paso por el origen es necesario determinar en cada medición. Para la determinación del paso por el origen hay que indicarle al sistema la intensidad de luz que va a tener cuando la concentración sea cero. Esto se consigue dejando que la intensidad de luz de la fuente atraviese el medio ausente de sustancia. A este paso se le denomina *calibración del medio*.

$$c = 0 \quad \log I = \log I_{\text{medio}} = \text{valor de calibración del medio}$$

Una vez calibrado el medio, se determina la pendiente de la recta anteponiendo una muestra patrón de concentración conocida a la fuente de luz. A esta operación se le denomina *calibración de la técnica*.

$$c = \text{concentración patrón} \quad \alpha = \frac{\log I_{\text{medio}} - \log I_{\text{muestra patrón}}}{\text{concentración patrón}}$$

Con estos valores determinados, la expresión de la intensidad en función de la

concentración es:

$$\log I = -\frac{\log I_{\text{medio}} - \log I_{\text{muestra patrón}}}{\text{concentración patrón}} c + \log I_{\text{medio}}$$

Despejando la c , queda:

$$c = -(\log I - \log I_{\text{medio}}) \frac{\text{concentración patrón}}{(\log I_{\text{medio}} - \log I_{\text{muestra patrón}})}$$

Para que la relación entre absorción total y concentración sean lineales, la luz incidente debe ser monocromática y su longitud de onda debe coincidir con el pico de máxima absorción de la sustancia a cuantificar.

La tinción de Feulgen está aceptada como tinción universal para la cuantificación del ADN por citometría de imagen. Las preparaciones teñidas con este reactivo tienen su pico de máxima absorción cuando se hace incidir una luz monocromática de longitud de onda igual o similar a 560 nm.

La muestra que contiene la sustancia que se desea cuantificar es expuesta a una fuente luminosa de intensidad conocida. Esta intensidad conocida procedente de la fuente de luz se la denomina *intensidad incidente*. La sustancia absorberá una determinada cantidad de intensidad incidente que desconoceremos, pero que según la ley de Lambert-Beer se podrá conocer si sabemos la luz incidente y la luz transmitida, ambas conocidas. La luz transmitida queda definida como la cantidad de luz incidente no absorbida por la sustancia¹⁶².

Así, en la citometría de imagen se necesita siempre, antes de valorar la muestra problema, una muestra patrón de concentración conocida de ADN para calibrar la técnica. La muestra patrón es una población estable y ausente de proliferación cuyo contenido de ADN es diploide. Son adecuados para este fin hepatocitos procedentes de rata o de células gliales del cerebelo humano. También se debe calibrar el medio, exponiendo una parte de la muestra sin núcleos a la fuente luminosa para determinar la intensidad de luz absorbida por el medio¹⁶².

1.5. DESCRIPCIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA EMPLEADO EN LA CITOMETRÍA DE IMAGEN POR ABSORCIÓN.

En este apartado pretendemos describir someramente las fases conceptuales y componentes del sistema de análisis de imagen, destacando aquellos aspectos considerados más relevantes sin detallar excesivamente, ya que quedaría fuera del propósito de este trabajo.

La muestra procesada y teñida adecuadamente con la tinción de Feulgen se deposita en el microscopio, y a partir de la imagen física del objeto se genera una imagen óptica. El objeto absorbe una determina cantidad de luz monocromática de longitud de onda conocida. La ley de Lambert-Beer nos permitirá saber la cantidad de sustancia que queremos medir (sustancia absorbente) al conocer la relación entre los valores correspondientes a la intensidad de luz incidente y la intensidad de luz transmitida.

En la citometría de absorción la intensidad de luz transmitida a través del objeto o sustancia se expresa en forma de densidades ópticas. Las densidades ópticas se relacionan con niveles de grises representados a modo de escala. Esta escala oscila entre 0 y 255 (256 niveles de grises) variando de forma gradual entre el negro (nivel 0) y el blanco (nivel 255)¹⁶³

En los sistemas de citometría de imagen se diferencian tres etapas fundamentales:

- 1) Adquisición de la imagen.
- 2) Procesado y análisis de la imagen.
- 3) Interfase de usuario o unidad de representación (Figura 14).

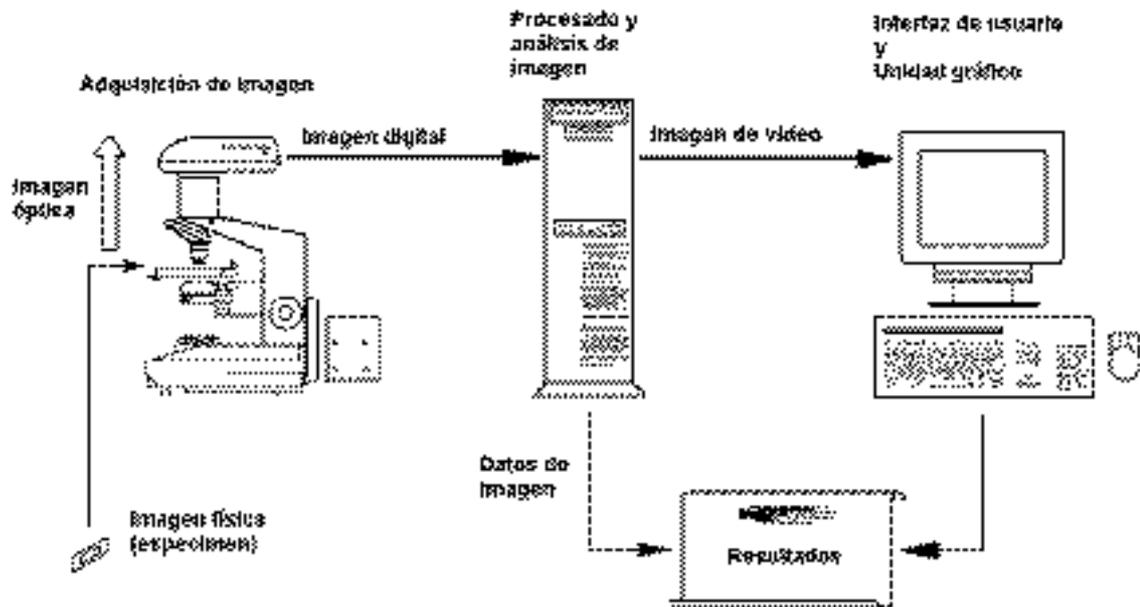


Figura 14.- Elementos básicos del equipo de citometría de imagen digital.

1.5.1. ADQUISICIÓN DE LA IMAGEN

En este paso el sistema proporciona los datos que se refieren a la imagen física original, determinando todo tipo de medidas que el usuario debe tener a su disposición para procesar y analizar la imagen (Figura 15).

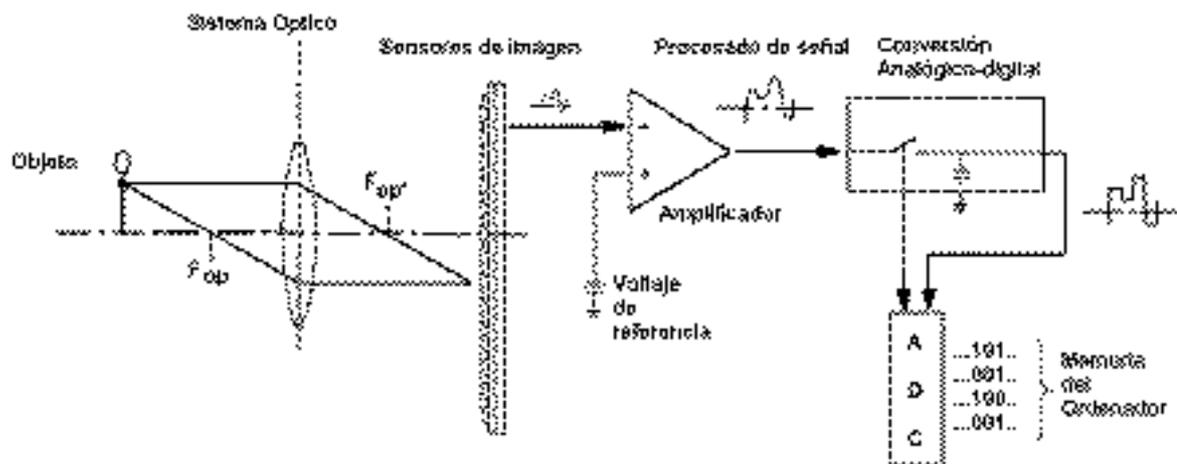


Figura 15.- Elementos básicos de un sistema de adquisición de imagen.

Es la fase de principal interés y proporciona dos tipos de información:

- la distribución espacial de los puntos que corresponde a la imagen en el espacio, identificados por las coordenadas x , y , z de cada punto y,
- la intensidad de luz transmitida, es decir, el número de fotones de una determinada longitud de onda que inciden en cada punto del espacio de la imagen.

Al exponer la muestra a una fuente luminosa podemos asociar a cada punto de la matriz un rayo luminoso que lo atraviesa. El rayo de luz saliente incide sobre una matriz de sensores, cada uno de los cuales por efecto fotoeléctrico, genera una señal eléctrica en función del número de fotones que inciden sobre él, es decir, en función de la intensidad lumínica que recibe. Al área de esta imagen física identificada por los sensores se le denomina *pixel*. A cada pixel asociado con una imagen le corresponde una señal eléctrica de un valor determinado, en función de la intensidad de luz transmitida recibida por cada sensor. De esta forma la intensidad lumínica se ha convertido en una señal eléctrica.

La imagen es analógica pues puede tomar cualquier valor posible dentro de un margen acotado (situación de máxima y mínima intensidad de luz). El valor de la señal eléctrica de cada punto de la matriz analógica se codifica en lenguaje binario (bits) para que sea accesible al ordenador y pueda almacenar y procesar los datos. A esta codificación se la denomina *digitalización*.

Por lo tanto, hasta ahora se ha partido de una matriz óptica, cada punto una intensidad transmitida, que se ha transformado en una matriz analógica, cada punto una señal eléctrica, y por último, se ha codificado en una matriz digital, cada punto un conjunto de bits.

La materialización de esta transformación de imágenes se lleva a cabo con los siguientes componentes:

- Microscopio óptico, que permite iluminar, enfocar, aumentar y proyectar la imagen. La formación de la imagen y su iluminación adecuada para la microscopía de absorción se basa en ajustar el microscopio a las condiciones de iluminación de Köhler.
- Sensores, que transforman la imagen óptica en una imagen de señales eléctricas.

- Instrumentos que digitalizan las señales, amplificadores, conversor analógico-digital y circuitos de muestreo y lectura^{163,164}.

A partir de la muestra adecuadamente procesada, el microscopio proporciona la imagen óptica enfocada y aumentada para su posterior proyección sobre los sensores.

La fuente de luz debe ser estable, lo que suele conseguirse con una bombilla halógena incandescente de 50 a 100 vatios de potencia que elimina fluctuaciones.

El ojo humano ve la imagen a través del ocular y la video-cámara acoplada al microscopio capta la imagen, de forma que ésta queda al alcance de la respuesta de los sensores.

Este tipo de video-cámara tiene como componente principal una matriz de sensores de imagen (charge coupling device, CCD, Figura 16).

En las video-cámaras de uso común, la dimensión habitual de los sensores es de 20 μm x 20 μm , es decir, por celda 400 μm^2 .

Aplicando objetivos de distintos aumentos a la imagen, se controla el tamaño del pixel. Por ejemplo, con la dimensión de sensor antes mencionada, y con aumentos del x4, x10 y x40, se obtiene respectivamente una unidad de área de imagen procesada de 5 μm x 5 μm (25 μm^2), 2 μm x 2 μm (4 μm^2) y 0.5 μm x 0.5 μm (0.25 μm^2).

Para cuantificar parámetros celulares como la textura, el tamaño, la forma nuclear, y el contenido de ADN, se debe trabajar con objetivo de como mínimo 40 aumentos.

Refiriéndonos a un tamaño de unidad de área de imagen de 0.25 μm^2 (objetivo x40), un núcleo de 10 μm de diámetro estaría cubierto por aproximadamente 300 pixeles. Aproximadamente un 25% de estos pixeles definen la periferia nuclear.

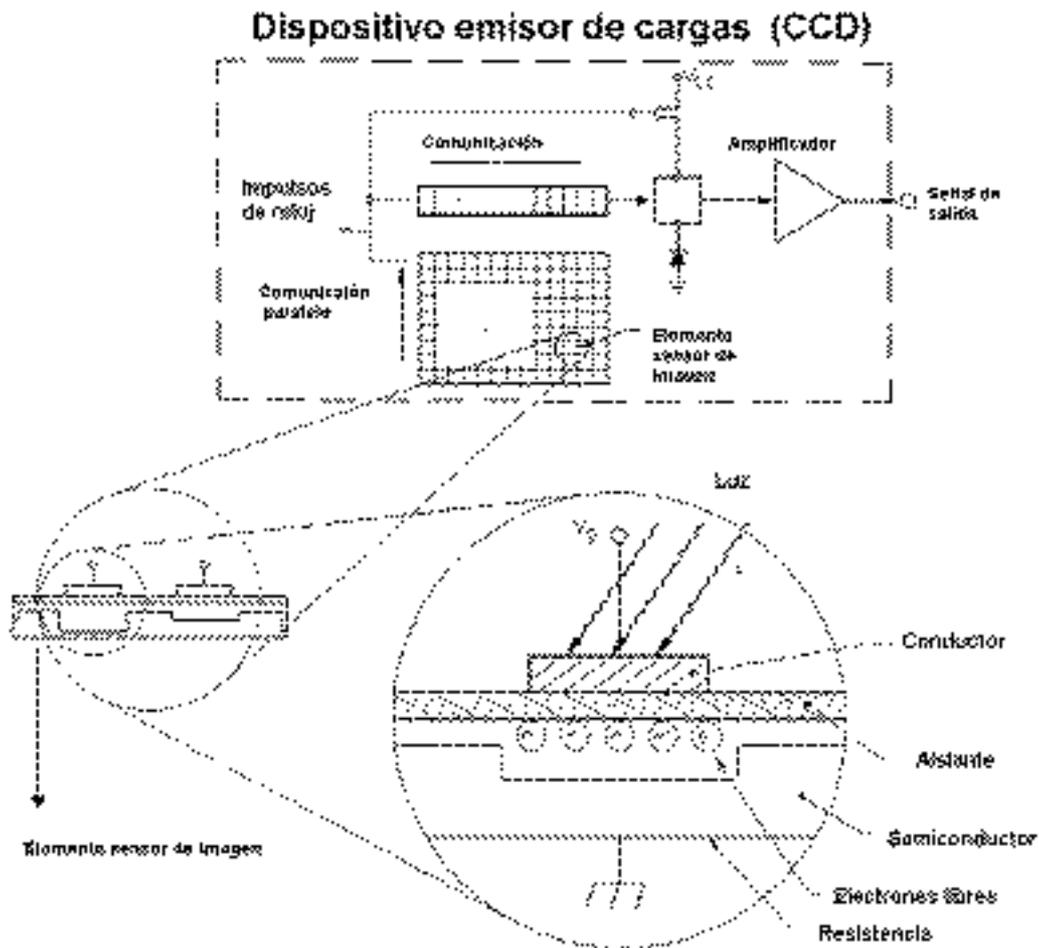


Figura 16.- Elementos sensores de imagen (CCD).

En estas condiciones, los cálculos de la forma nuclear o textura que describe la distribución del ADN en el núcleo son poco precisos. Si se han de detectar cambios cuantitativos del ADN en función de su distribución espacial, con el fin de medir la textura cromatínica se requiere una mayor distribución espacial, es decir, un mayor número de píxeles por núcleo. Pero esto tiene un inconveniente, pues a mayor aumento (x60-x100) el campo de visión se reduce y la profundidad focal disminuye ($<0.2 \mu\text{m}$). La mayoría de los sistemas trabajan con un poder de resolución correspondiente a un tamaño de pixel de $0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ ($0.25 \mu\text{m}^2$) que es una solución de compromiso.

Otra alternativa, es trabajar con una video-cámara científica de un tamaño de sensor de $6.8 \mu\text{m} \times 6.8 \mu\text{m}$, lo que equivale a aumentar el número de sensores por unidad de área. Por ejemplo, aplicando 20 aumentos se obtiene un pixel de $0.34 \mu\text{m} \times 0.34 \mu\text{m}$ ($0.1 \mu\text{m}^2$), y una profundidad de campo $> 1 \mu\text{m}$, que permite captar muchos núcleos en el mismo foco, conservando al mismo tiempo una elevada resolución espacial.

Los objetos están frecuentemente en diferentes planos focales, en este caso se deben seleccionar de forma secuencial garantizando que cada uno de ellos esté en el mismo plano focal. Si no se cumple esta condición se cometen errores en la cuantificación de la muestra.

1.5.2. PROCESADO Y ANÁLISIS DE LA IMAGEN

En la etapa de procesado y análisis de imagen, la imagen digitalizada es introducida en el ordenador con el fin de procesarla.

Una vez introducida la matriz digital en el ordenador, éste es capaz de asociar cada punto de la matriz con una posición espacial y una intensidad de luz transmitida desde ese punto de la imagen del objeto perteneciente al espécimen. Esta información, intensidad de luz transmitida en un punto localizado, es lo que se necesita para la realización del procesado y análisis de la imagen.

Existen un conjunto de algoritmos y esquemas que definen la información a utilizar, el conjunto de operaciones a realizar y en que orden para obtener los resultados requeridos (parámetros morfológicos, de textura, densitométricos, etc...).

Los algoritmos para obtener un mismo resultado no son siempre iguales. Aunque el concepto asociado al resultado es único e invariable, el programador puede diseñar esquemas más o menos imaginativos que sean eficaces para la utilización de los recursos del ordenador y para adaptarse a la problemática que se pretende resolver.

En cualquier caso, una vez decididos los algoritmos, el usuario no tiene más remedio que adaptarse a lo que el sistema operativo sea capaz de ofrecer.

1.5.3. INTERFASE DE USUARIO O UNIDAD DE REPRESENTACIÓN.

La interfase de usuario abarca todo lo referente a la interacción entre el usuario y el sistema operativo o Software. Por lo tanto, esta última etapa es totalmente dependiente del sistema que se esté utilizando.

En función de cómo sea éste, el usuario del mismo tendrá mayor o menor acceso a los parámetros que controlan el sistema, podrá ejecutar las acciones con más o menos comodidad y adaptar con mayor o menor libertad el programa a sus objetivos concretos.

En general, un sistema operativo diseñado para sistemas de citometría de imagen provee al usuario de herramientas para realizar las siguientes operaciones:

- calibración de las medidas,
- selección y manipulación de los objetos (núcleos) incorporados a la muestra,
- cálculo de parámetros citométricos y presentación de resultados,
- gestión de los archivos asociados a los especímenes tratados,
- utilización de dispositivos periféricos como por ejemplo, pantallas, impresoras, puertos de comunicación,
- representación de resultados en formato gráfico o texto.

1.6. PARÁMETROS NUCLEARES CUANTIFICADOS.

En general, los parámetros que se cuantifican se clasifican en los siguientes grupos¹⁶⁵:

- *Morfométricos*, cuantifican variables descriptivas del tamaño y la forma.
- *Densitométricos*, cuantifican la densidad óptica.
- *Colorimétricos*, se basan en la evaluación de propiedades espectrales.
- *De textura*, valoran la variación de densidad óptica de la cromatina.
- *Contextuales*, establecen relaciones entre las distintas partes de las células y los conjuntos de células presentes en el espécimen.

Una vez localizados y enfocados correctamente los núcleos sometidos a estudio (adquisición de imagen), se efectúa el procesado y análisis de la imagen, lo que requiere una operación previa denominada *segmentación*.

Este proceso identifica los píxeles pertenecientes a los núcleos celulares en estudio, y el proceso de segmentación consistirá en reconocer a cada uno de los píxeles de la imagen digital como perteneciente al núcleo o al fondo.

En el caso de la evaluación de los parámetros morfométricos, nos basta la imagen segmentada ya que se prescinde de la escala de grises. En cambio, los parámetros densitométricos, tienen en cuenta los niveles de la escala de grises extraídos de la imagen digitalizada.

El nivel de intensidad de luz por encima del cual, se considera que un píxel pertenece al fondo se denomina *nivel o intensidad umbral*. Todos los píxeles de mayor intensidad que la umbral se les hace corresponder al fondo y el resto al núcleo.

Por lo tanto, el resultado de la segmentación es la formación de una imagen binaria de dos colores en la cual, los píxeles están asociados a diferentes números según la entidad a la que pertenecen, por ejemplo, núcleo con el 1 y fondo con el 0¹⁶³.

La finalidad de la segmentación es identificar rápidamente las celdas de la matriz o píxeles de la imagen digital que se han de considerar en la cuantificación de los parámetros posteriores.

Actualmente, se ha llegado a la conclusión de que la información que proporciona el núcleo es suficiente para clasificar las células. En la literatura, se citan cerca de un centenar de características nucleares, pero sólo unas pocas tienen interés biológico. Como características nucleares fundamentales de interés biológico se consideran el *área nuclear*, la *densidad óptica integrada* (DOI) y la *densidad óptica media* (DOM).

Para el objeto de este trabajo hemos utilizado los parámetros pertenecientes a los grupos morfométricos y densitométricos.

1.6.1. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS.

Estos parámetros dependen únicamente de la forma y dimensión del núcleo, siendo independientes del nivel de intensidad de luz. En general se refieren a características:

- *Geométricas*: describen las dimensiones de los núcleos, el área, anchura, longitud, perímetro,
- *Momento de área*: describen la forma del área del núcleo por medio de sus momentos geométricos respecto a ejes que pasan por el centro de gravedad del núcleo.
- *Forma del núcleo*: queda descrita por medio de la evaluación de las características del perímetro, rugosidad, ajuste a formas regulares.

El área nuclear es el parámetro morfométrico más utilizado. Su valor se obtiene a partir del resultado de la segmentación, que tal como comentamos previamente, identifica los píxeles que corresponden a cada uno de los núcleos. Su cálculo es directo y consiste en contar el número de píxeles que corresponden a cada uno de los núcleos y multiplicarlos por el área real correspondiente a un píxel. El sistema operativo realiza estos cálculos tantas veces como núcleos se cuantifiquen en la muestra sujeta a estudio.

Para calcular el perímetro, se debe saber cuantos pixeles configuran el contorno del núcleo y multiplicar este número por la longitud asignada a cada pixel, siempre partiendo del resultado de la segmentación.

La situación más favorable para considerar que la segmentación es de buena calidad es que ésta, en función de la intensidad umbral utilizada, sea capaz de excluir o incluir un pixel del contorno.

Si la calidad de la segmentación ha sido buena, el resultado de los parámetros morfométricos también lo será, ya que estos parámetros dependen muy poco de las variaciones en la intensidad de luz, características de la tinción y niveles de grises.

Se aconseja escoger aumentos de imagen de forma tal que como mínimo un núcleo de un diámetro de 8 μm quede representado por 100 pixeles.

Cuando se toman mayores aumentos se consiguen imágenes más detalladas del perímetro y del área nuclear, por ello la elección de los aumentos depende de la precisión que queramos conseguir en la cuantificación del área y del perímetro del núcleo.

1.6.2. PARÁMETROS DENSITOMÉTRICOS.

Los parámetros densitométricos evalúan la densidad óptica y sus variaciones sin tener en cuenta su distribución espacial dentro del núcleo, utilizando la escala de grises.

Dentro de los múltiples parámetros densitométricos que se han definido, para nuestro trabajo hemos utilizado los que se enumeran a continuación disponibles en nuestro software:

- Densidad óptica integrada (DOI),
- Densidad óptica media (DOM),
- Desviación estándar de la DOM,
- Índice de asimetría de la DOM (skewness),

- Índice de aplastamiento de la DOM (kurtosis).

Estos parámetros pueden relacionarse con la densidad óptica (DO) o con los niveles de grises o la intensidad luminosa recibida por los sensores.

La densidad óptica es proporcional a la concentración de sustancia absorbente siguiendo la ley de Lambert-Beer. La constante de proporcionalidad y el nivel de concentración cero quedan determinados y ajustados con la calibración del medio y de la técnica (patrón de referencia externa)

La DOI es la suma de las densidades ópticas de cada uno de los píxeles que le corresponden a un núcleo. Para la obtención del histograma de densidades ópticas integradas, es imprescindible disponer de todas las densidades ópticas integradas de cada uno de los núcleos seleccionados. Nuevamente estos cálculos los realiza el sistema operativo.

La DOM se obtiene dividiendo la densidad óptica integrada por el área de cada núcleo (DOI/área).

El resto de parámetros, desviación estándar, índice de asimetría (skewness) e índice de aplastamiento (kurtosis) coinciden con las definiciones estadísticas clásicas, y su utilidad es el estudio del histograma de densidades ópticas integradas.

1.7. RELACIÓN DE LOS PRINCIPALES PARÁMETROS DENSITOMÉTRICOS CON LAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS TUMORALES

Los parámetros densitométricos de interés mencionados en el apartado anterior, nos permiten el cálculo de una serie de valores obtenidos a partir de los mismos, que nos proporcionarán las características biológicas de los tumores en estudio, ofreciendo información referente a la ploidía del ADN, estado de proliferación, cantidad de poblaciones formadas por células malignas o atípicas^{143,166}.

Las principales valoraciones que obtendremos son:

- *Grado de ploidía* (DP): Calcula el porcentaje (%) de células con valores 2c, 4c y 8c, frente al resto de núcleos. Este valor puede variar entre -100% y +100% e indica la euploidía o aneuploidía estimada de cada muestra.
- *Grado de hiperploidía* (DH): Calcula el porcentaje (%) de núcleos con ADN mayor de 5c (sinónimo de 5cER).
- *Grado de aneuploidía* (DA): Complementario e inverso al grado de ploidía.
- *Balance de ploidía*: Diferencia entre el porcentaje de células diploides y de células aneuploides.
- *Índice de proliferación* (IP): Representa el porcentaje (%) de células ubicadas entre los picos con doble y mitad de contenido de ADN, que el correspondiente al pico mayor de los histogramas. Indica la actividad proliferativa de la muestra. La proliferación puede ser:
 - nula: índice de proliferación entre 0 y 1%;
 - débil: índice de proliferación entre 1 y 10%;
 - media: índice de proliferación entre 10 y 15%;
 - alta: índice de proliferación entre 15 y 20%.
- *Índice de ADN* (IADN): Se calcula directamente a partir del histograma de las células distribuidas conforme a su contenido de ADN. Es la relación entre el contenido medio de ADN correspondiente al pico de la población más aneuploide y el contenido de ADN del

valor de referencia $2c$.

- *Índice de desviación respecto a $2c$ (2cDI)*: Es la suma de los cuadrados de las diferencias de las concentraciones de ADN de cada uno de los núcleos (c_i) respecto al valor de referencia ($2c$). El resultado de esta suma se divide por el número total de núcleos considerados en la muestra:

$$2cDI = \frac{\sum_{i=1}^N (c_i - 2c)^2}{N}$$

- *Índice de malignidad (IM-ADN)*: Es el producto formado por 2cDI y 5cER

- *Grado de malignidad (GM-ADN)*: Útil dada su capacidad para expresar por medio de números el significado biológico tumoral aportando de esta forma objetividad¹⁶⁷. Se obtiene a partir de la siguiente fórmula matemática:

$$"GM - ADN" = 3 \frac{\log("IM - ADN"+1)}{\log 3758} = 0.84 \log("IM - ADN"+1)$$

- *Histogramas de concentración de ADN*: Son la representación gráfica de las distintas poblaciones celulares presentes en la muestra en función de su contenido de ADN. Aunque de uso frecuente no está exenta de subjetividad. La clasificación de los histogramas más sencilla y universalmente aceptada es la propuesta por Auer et al. en 1984¹⁶⁸.

**Tipo I*: histogramas con un único pico diploide ($2c$) y escasas células desviadas del valor normal (Figura 17).

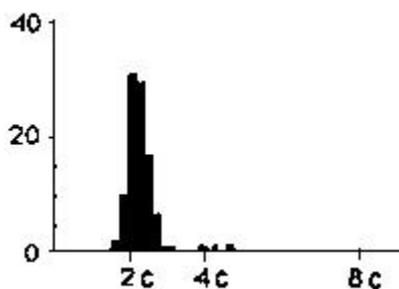


Figura 17.- Histograma tipo I.

**Tipo II*: pueden darse dos posibilidades,

a) un pico en la región tetraploide (Figura 18) o,

b) dos picos, uno en 2c y otro en 4c con escasas células comprendidas entre dichos picos o entre 4c y 8c (Figura 19).

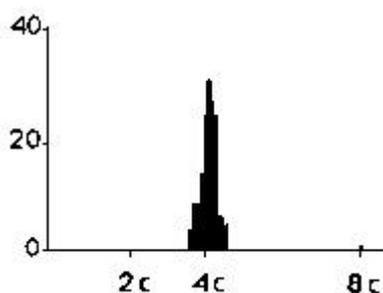


Figura 18.- Histogramas tipo II a.

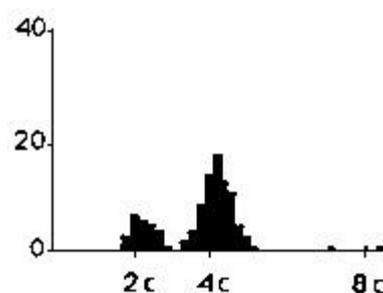


Figura 19.- Histogramas tipo II b.

**Tipo III*: difiere del tipo II en que presenta un número elevado de células con contenido de ADN entre 2c y 4c, además existe una proporción de células consideradas en fase S que indican proceso proliferativo (Figura 20).

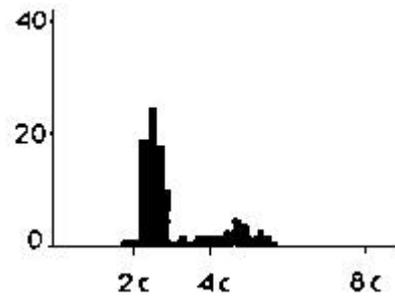


Figura 20.- Histograma tipo III.

**Tipo IV*: presentan aneuploidía marcada de ADN con valores muy dispersos y la mayoría de células con un contenido en ADN > 5c (Figura 21).

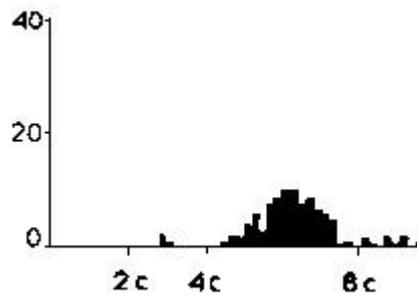


Figura 21.- Histograma tipo IV.

1.8. FACTORES QUE PUEDEN ALTERAR LA CUANTIFICACIÓN CITOMÉTRICA

La citometría de imagen es una técnica cuantitativa y requiere que las muestras sigan un procesamiento riguroso y estandarizado^{169,170,171}.

La calidad del proceso analítico depende básicamente de los cuidados dedicados a las etapas de adquisición y procesamiento de la muestra. El procesamiento de la muestra varía en función de la técnica empleada para la obtención del tejido. El objetivo final es la adquisición de extensiones histológicas o cortes histológicos representativos de la muestra tumoral sobre los que se practicará el análisis citométrico.

Para la obtención y preparación de la muestra se utiliza el algoritmo siguiente:

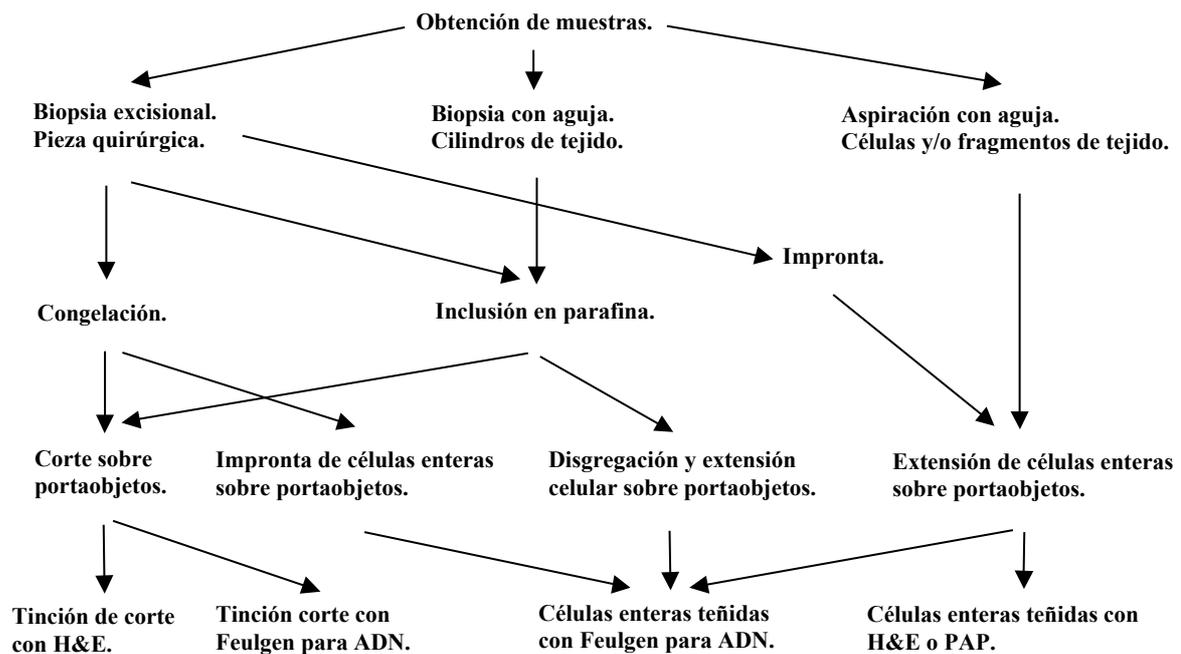


Figura 22.- Algoritmo para la adquisición de la muestra.

Cada una de las fases mostradas en el algoritmo de adquisición de la muestra debe ser independiente de las demás, con la finalidad de intentar evitar errores que introducirán inexactitudes o variaciones en los resultados finales^{172,173}.

Durante la fase de obtención de la muestra para evitar errores, se debe garantizar la representatividad del tumor lo cual implica la selección de zonas tumorales bien preservadas evitando zonas de necrosis, fibrosis o ulceraciones.

Para medir el ADN debemos disponer de núcleos enteros y separados unos de otros. Se pueden utilizar tanto tejidos frescos de los cuales se obtienen improntas tumorales, o bien tejidos parafinados a partir de los que se puede obtener una suspensión nuclear^{174,175,176}. Este proceso para la obtención de suspensiones nucleares a partir de tejidos parafinados será expuesto con detalle en el apartado de Material y Métodos.

Cuando la arquitectura tisular es un factor importante para identificar las regiones representativas, o si el tejido no es apto para disgregación, o si el número de células que se pretenden medir es escaso, podremos utilizar cortes histológicos, teniendo en cuenta que se pueden introducir errores asociados al grosor del corte y al hecho de que no estaremos contando núcleos enteros, sino fracciones de ellos. No existe un grosor ideal que resuelva este problema, aconsejándose un corte histológico cuyo grosor excluya las superposiciones nucleares pero que a la vez garantice la presencia de núcleos enteros. Se aceptan cortes histológicos con grosor estándar de 5 micrómetros^{143,177,178}.

Una vez obtenida la muestra debe ser fijada con la finalidad de preservar la morfología y composición química de la célula. Las soluciones fijadoras son mezclas de sustancias químicas eligiéndose una u otra en función del propósito perseguido. La fijación del núcleo requiere soluciones fijadoras de naturaleza ácida¹⁴³

Se han descrito gran cantidad de soluciones fijadoras resultantes de la mezcla de sustancias químicas en determinadas proporciones (Tabla 4).

Tabla 4.- Soluciones fijadoras y sus componentes químicos.

	CLA	PET √	CAR	ZEN √	SMI √	HEL √	MAX √	PARA √	FOR √	REG √	B-S √
Ácido acético (%/vol)	25	15	10	4.76	2.4						5
Etanol 100 (%/vol)	75		60								
Etanol 95 (%/vol)		33.3									
Metanol (%/vol)											80
Ácido nítrico (%/vol)		1.7									
Paraformaldehído (%W/vol)								4			
Formaldehído (%/vol)					9.6	4.76	9.1		10	20	15
Dicromato de potasio (%/vol)				0.08	0.02	0.08	0.084			0.08	
Cloruro de mercurio (%/vol)				0.17		0.17					
Sulfato sódico (%/vol)				0.028		0.028	0.03				
Cloroformo (%/vol)			30								

CLA= Clark; PET= Petrunkevitch; CAR= Carnoy; ZEN= Zenker; SMI= Smith; HEL= Helly; MAX= Maximov; PARA= paraformaldeído; FOR= formol; REG= Regaud; B-S= Böhm-Sprenger. Solución acuosa

Las soluciones fijadoras pueden modificar los parámetros nucleares morfométricos, densitométricos y texturales. Así, los núcleos fijados con formol tienen un tamaño inferior que los que se fijan con carnoy, repercutiendo en la distribución de la cromatina nuclear. Los núcleos pequeños presentan una mayor proporción de cromatina condensada (heterocromatina) y captan mayor concentración de colorante. En cambio, los núcleos mayores con una mayor proporción de cromatina descondensada (eucromatina) captan menor concentración de colorante. De la misma forma, la densidad óptica media (DOM) se ve influenciada por el tipo de fijador utilizado. En general, para conseguir la homogeneidad de la condensación cromatínica interesa fijar en formol^{179,180,181,182}.

Una vez fijadas y tratadas las muestras para obtener la suspensión nuclear, las suspensiones nucleares son teñidas con la tinción de Feulgen, universalmente aceptada para la identificación y cuantificación del ADN¹⁸³, aunque en sentido estricto más que una tinción es una reacción cromogénica.

La intensidad de la coloración se evalúa objetivamente mediante la medida de la densidad óptica integrada (DOI) de los núcleos analizados. Para cualquier fijador, el tiempo óptimo de hidrólisis respecto a la intensidad de la tinción, corresponde al tiempo en el que la

medida de la DOI es máxima, siendo esto equivalente a la máxima intensidad de coloración. De esta forma, una vez determinadas las condiciones óptimas del tiempo de hidrólisis el contenido total de ADN nuclear es directamente proporcional a la DOI medida. Los parámetros texturales, fundamentalmente la arquitectura cromatínica, dependerá de la acción química que sobre los componentes cromatínicos ejerzan las sustancias presentes en la solución fijadora utilizada¹⁸⁴.

La hidrólisis ácida a la que se someten los núcleos durante la tinción de Feulgen también puede alterar la DOI, así los núcleos con mayor cantidad de cromatina condensada requieren mayor tiempo de hidrólisis para alcanzar una DOI óptima en comparación con los núcleos con mayor proporción de cromatina descondensada.

Para obtener tinciones óptimas se recomienda ajustar el tiempo de hidrólisis ácida en función del fijador utilizado y de las características del tejido¹⁷⁹.

La importancia de las tinciones cuantitativas, imprescindibles en la citometría de imagen, se basa en que de ellas depende la exactitud de los resultados finales referidos a la cantidad de ADN y clasificación de la ploidía.

1.9. FUNDAMENTOS QUÍMICOS DE LA TINCIÓN NUCLEAR MEDIANTE LA REACCION DE FEULGEN.

Durante la reacción de Feulgen se diferencian dos etapas:

1) La muestra es sometida a hidrólisis ácida que separará las bases purínicas de la molécula de ADN, quedando los grupos aldehído libres. Esta fase constituye uno de los pasos más críticos en la reacción de Feulgen.

2) Se produce una reacción química entre los grupos aldehído libres y el reactivo de Schiff (fucsina básica) quedando unidos por medio de enlaces covalentes originando un compuesto coloreado. El color del producto final puede variar en función de los componentes utilizados. Este proceso de coloración tiene escasa repercusión sobre los núcleos ya que no modifica la apariencia textural del núcleo visualizado en el microscopio. En citometría de absorción, los componentes más utilizados son la pararosanilina y la tionina.

La reacción química de Feulgen es una reacción estequiométrica, es decir, se produce mol a mol, por lo que es una tinción cuantitativa. En una tinción cuantitativa, la interacción entre el colorante y el sustrato problema debe seguir reglas específicas, y mantener una correlación cuantitativa entre cantidad de sustrato y número de moléculas de colorante que se unen al sustrato. El número de moléculas de colorante se pueden medir por medio de aparatos ópticos, que respetando la ley de Lambert-Beer determinarán la concentración de colorante presente en el sustrato problema.

La importancia de las tinciones cuantitativas utilizadas en la citometría de imagen por absorción, radica en que de ellas depende la exactitud de los resultados finales referentes a la clasificación del patrón de ploidía del ADN tumoral. Hoy en día, la reacción de Feulgen introducida por Feulgen y Rossenbeck en 1924, sigue siendo considerada de forma universal como la técnica de elección para la tinción estequiométrica del ADN^{181, 185}.

De forma rutinaria, las condiciones establecidas para la reacción de Feulgen son¹⁸⁶:

- Hidrólisis ácida con HCl 5M a 25°C durante una hora.
- Parar el proceso hidrolítico añadiendo agua destilada.
- Tratamiento con el reactivo de Schiff (fucsina básica/color rojo; tionina/color azul) durante una hora. Se debe verificar que el reactivo cubre totalmente la lámina que contiene la muestra.
- Eliminar el exceso de colorante con una solución de sulfito.

Junto a las muestras problema se debe teñir una muestra control la cual no ha sido sometida a hidrólisis ácida y que deberá permanecer incolora cuando se aplique el colorante.

1.10. UTILIDAD DE LA CITOMETRÍA DE IMAGEN

Las técnicas de cuantificación del ADN tales como la citometría de flujo y de imagen, han despertado un gran interés en el mundo científico, por su capacidad para aportar objetividad y reproductibilidad al estudio anatomopatológico, así como, por la variedad de aplicaciones clínicas que poseen, observándose una estupenda correlación entre los resultados obtenidos tanto por citometría de flujo como por citometría de imagen^{187,188}.

Entre sus utilidades destacan^{189,190}:

- 1) *Diagnóstico*: La aneuploidía del ADN es el marcador de malignidad más universalmente aceptado.
- 2) *Pronóstico*: La ploidía tumoral refleja el comportamiento biológico de una gran cantidad de tumores, de forma tal que en general, los tumores diploides suelen tener mejor pronóstico que los tumores aneuploides. También tiene valor predictivo en la valoración de atípias premalignas.
- 3) *Control de calidad*: Uno de los principales potenciales de la citometría está en el área del control de calidad de los diagnósticos citológico e histológico.
- 4) *Valoración de la respuesta a la terapia*: Puede monitorizar la respuesta a radiación y /o a quimioterapia. Por ejemplo, si después de realizar una quimioterapia las muestras mantienen un elevado índice de aneuploidía, indicará pobre respuesta al tratamiento. También se ha extendido su uso para valorar el efecto de las drogas anticancerosas en la proliferación tumoral, o su influencia en la cinética celular ya que por ejemplo, los agentes alquilantes detienen a las células en la fase G2. De igual forma, permiten medir las alteraciones de la textura cromatínica dado que algunos antimetabólicos aumentan el área nuclear.
- 5) *Valoración de tumores muy heterogéneos*.
- 6) *Cuantificación de tinciones inmunohistoquímicas* reduciendo la subjetividad inherente a la cuantificación visual de las tinciones. La ventaja es que además, cualquier anticuerpo utilizado en inmunohistoquímica puede ser cuantificado por citometría de imagen.

7) *Valoración de la proliferación*: Los actuales sistemas operativos disponen de los algoritmos necesarios para calcularlo.

8) *Diagnóstico precoz de micrometástasis*.

9) *Clasificación de la morfología de los espermatozoides*.

En el manejo del cáncer vesical puede ser muy útil en el seguimiento de la respuesta al tratamiento intravesical del tumor vesical superficial. La presencia de histogramas aneuploides puede sugerir la presencia de recidiva tumoral e insuficiente respuesta al tratamiento endovesical¹⁹¹.

En los tumores infiltrantes su papel está más discutido y hasta el momento no se considera un factor definitivo a la hora de realizar recomendaciones terapéuticas. En el seguimiento de la respuesta a quimioterapia y/o radioterapia, la presencia de poblaciones aneuploides puede indicar fracaso de los mismos.

La citometría hasta el momento, no puede ser utilizada como un test de diagnóstico precoz de tumor vesical en pacientes sin historia previa de cáncer vesical ni en el estudio de microhematuria, dado que su especificidad es demasiado baja para poder darle este uso¹⁹⁰.

En el campo de la urología puede ser utilizada también en el seguimiento de tumores renales. Se ha visto que los tumores renales hiperdiploides presentan peor pronóstico que los diploides^{192,193}, en la valoración de testículos criptorquídicos y seminomas, pues se han objetivado altos índices de aneuploidía en el seminoma clásico y seminoma espermatocítico. En el cáncer de próstata los resultados son controvertidos por las características de estos tumores^{189,190}.

El estudio citométrico se ha extendido a todos los órganos y tipos de tumores¹⁸⁹, ovario, útero, mama, colon, pulmón, aparato gastrointestinal, melanomas y sarcomas.

Estas peculiaridades del cáncer vesical superficial obligan a la práctica frecuente de citologías de orina, urografías endovenosas, cistoscopias, resecciones transuretrales, con la intención de detectar rápidamente el momento de la recidiva y/o progresión de la enfermedad hacia formas invasivas que pondrán en peligro la vida del paciente siendo necesarias en estos

casos terapias más agresivas como la cistectomía radical.

Sería de gran utilidad poder detectar aquellos pacientes con un riesgo aumentado de recidiva y/o de progresión de la enfermedad en un intento de “*predecir*” la evolución y de planificar de forma individualizada la estrategia terapéutica para cada individuo.

El desarrollo de técnicas como la citogenética, citometría y biología molecular ha aportado notables avances al conocimiento de la historia natural y alteraciones del genoma en las neoplasias vesicales siendo cada día más evidente su utilidad en la práctica diaria. Estas técnicas pueden permitir el establecimiento de protocolos que faciliten la planificación de estrategias terapéuticas universales pero a la vez individualizadas. Con estos avances podríamos preveer, y por lo tanto predecir, el comportamiento de cada tipo de tumor y la evolución de cada paciente. Ello, podría facilitar la elección correcta y precoz del esquema terapéutico más adecuado para cada caso, evitando controles excesivos en aquellos que presentarán un comportamiento más benigno y poniendo más énfasis en aquellos tumores con un potencial de agresividad mayor, los cuales precisarán de actitudes terapéuticas más radicales ofreciendo así, la posibilidad de ser aplicadas antes de que la enfermedad progrese (cistectomía radical temprana). De la misma forma podrían evitar la práctica de tratamientos mutilantes en aquellos individuos que no lo requieren.