

# EMA Y LCA EN CITOLOGÍA POR ASPIRACIÓN DE AGUJA FINA

*Dr. Francisco José Herrera Alvarado\**

## ABSTRACTO

Se realiza un análisis morfológico e inmunohistoquímico del material citológico exfoliativo, y del obtenido mediante biopsia aspirativa por aguja fina (AAF). Este último fue recolectado directamente de los especímenes quirúrgicos por el autor del trabajo.

Los cincuenta (50) casos comprendidos en el estudio fueron analizados usando Antígeno Epitelial de Membrana (EMA) y Antígeno Leucocitario Común (LCA). De ellos el 40% fijados en acetona pura, el cual mostró ser el fijador más adecuado y evidenció una excelente correlación con el diagnóstico anatomopatológico definitivo. El 60% restante, en el cual se utilizó alcohol etílico al 95% como fijador, no arroja resultados confiables desde el punto de vista inmunohistoquímico.

Estos hallazgos muestran el claro potencial aun no desarrollado rutinariamente de la inmunoperoxidasa, como coadyuvante en el diagnóstico citológico, aumentando indudablemente la precisión; asimismo corrobora la enorme utilidad de la AAF en la práctica de la citopatología.

## INTRODUCCIÓN

La citología se ha constituido tradicionalmente en arma diagnóstica de incalculable valor para el anatomopatólogo. La biopsia aspirativa por aguja fina (AAF) un método descrito por Guthrie en 1921, (1) ha sido "redescubierto" recientemente, ampliando en forma significativa el espectro diagnóstico

Citológico; ya que con los actuales procedimientos radiológicos se ha logrado fácil acceso a lesiones que previamente sólo podían abordarse con cirugía. En muchos casos este material citológico será el único disponible para poder esbozar una conclusión diagnóstica, que decidirá una conducta terapéutica determinada. Esto nos obliga a considerar la importancia que conlleva el análisis óptimo de las muestras, para sustraer de las mismas toda la información posible, independiente de la forma como estas sean recolectadas, sea AAF o citología exfoliativa clásica (CEC).

En diversos laboratorios en los cuales la citología se encuentra bien implementada, se reporta una adecuada correlación de esta con el tejido en parafina, de 80 a 90% y de los casos que no correlacionaron, el 95% son falsos negativos, que pueden ser atribuidos en algunas ocasiones principalmente a la deficiencia en el muestreo de la lesión.

En este reporte pretendo enfatizar la inobjetable utilidad de la AAF, y asimismo encontrar un método adecuado confiable y fácilmente reproducible para realizar estudios inmunohistoquímicos en todo tipo de material y así incrementar la precisión diagnóstica especialmente en tumores indiferenciados.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Cincuenta casos de citología se incluyeron en el estudio, seis líquidos pleurales (12%), tres líquidos ascíticos (6%), dos improntas de ganglios linfáticos (4%), un líquido cefalorraquídeo, (2%), un raspado de superficie de corte de ganglio linfático (2%) y 38 AAF (76%). Todas las muestras se obtuvieron en el Departamento de Patología del Hospital Jackson Memorial de Miami, Estados Unidos.

---

Residente de 4o. año de Anatomía Patológica Previa Opción al Título de Especialista Servicio de Patología Hospital Dr. Rafael Ángel Calderón Guardia, San José, Costa Rica, Marzo de 1987  
Profesor Titular III del Departamento de Patología, UNAH, Patólogo del Hospital Escuela.

Los líquidos de las muestras enviadas a citología, las improntas, el raspado y las AAF fueron realizadas en piezas quirúrgicas frescas en el momento de la congelación.

Inicialmente las muestras fueron fijadas en alcohol etílico al 95o/o durante 15 minutos y luego lavadas con solución salina normal por espacio de una hora. Posteriormente algunos casos fueron fijados en forma similar y luego tratados con tripsina (2, 3). Otro grupo fue dividido para ser fijado en alcohol etílico frío (1 oC) (4, 5) además a temperatura ambiental (25oC). Las muestras a temperatura ambiental permanecieron en alcohol o en acetona por dos a tres minutos y luego secadas al aire. Las muestras frías se mantuvieron a la misma temperatura.

Todos los casos fueron evaluados mediante la interpretación morfológica de la coloración de Papanicolau y luego laminillas adicionales se tiñeron por el método inmunohistoquímico descrito por Hsu et al (6, 7), utilizándose anticuerpos monoclonales como el Antígeno Epitelial de Membrana (EMA) y el Antígeno Leucocitario Común (LCA). Se seleccionaron estos anticuerpos debido a su potencial valor en la clasificación de tumores indiferenciados, intentando definir su origen epitelial o linforreticular.

El LCA es un anticuerpo que reacciona con una glicoproteína con un peso molecular de 200.000, encontrándose en la superficie de células hematopoyéticas y sus tumores, pero no reacciona con carcinomas o sarcomas. (10,11). El EMA es una glicoproteína encontrada en diversas moléculas que representan constituyentes integrales de la membrana apical de células epiteliales ampliamente distribuidas en el tejido mamario normal aun durante la lactancia (4).

Brevemente después de hidratarse con alcoholes sucesivos de 100 a 90o/o, las laminillas, fueron tratadas secuencialmente con diluciones óptimas de los anticuerpos monoclonales ya mencionados, anticuerpos biotinizados contra IgG de ratón y el Complejo Avidina-Biotina. La actividad de la peroxidasa se visualizó mediante el uso de Diaminobenzidina como cromógeno, en presencia de peróxido de hidrógeno. Controles positivos conocidos fueron evaluados en forma simultánea. La sustitución del anticuerpo primario por una solución salina fue considerado el control negativo (3).

Cinco casos fijados en alcohol etílico al 95o/o y cinco en acetona pura fueron estudiados inmunocitoquímicamente utilizando el método Fosfatasa Alcalina-Anti Fosfatasa Alcalina (APAAP). Este método comprende complejos solubles de Fosfatasa Alcalina y de Anti Fosfatasa Alcalina monoclonal (ratón). Un "emparedado" típico con el método APAAP consiste en: 1) Antisuero de ratón (mono o policlonal) al antígeno tisular en dilución óptima, 2) Inmunoglobulinas antirratón producidas en conejo (dilución 1:25 a 1:50), 3) APAAP (8,9), diluido 1:10 al:50,4)NafthoL AS-MX mas sal TR, Fast Red. Como último paso se debe teñir utilizando hematoxilina de Mayer. El suero normal de conejo es útil para reducir la tinción del fondo en el caso de usarse un anticuerpo primario de tipo monoclonal. En general este método es especialmente útil ya que con él hay menos tinción del fondo secundaria a la peroxidada endógena. Para las diluciones necesarias en este procedimiento, se utiliza únicamente solución de Tris.

Los reactivos utilizados fueron obtenidos comercialmente de Dako Corporation (Santa Bárbara, California), y los de Biotina-Avidina de Vector Laboratories (Burlingame, California)

## RESULTADOS

Al analizar los casos morfológicamente mediante la tinción de Papanicolau, desafortunadamente se conocía el diagnóstico en 15 de ellos (30o/o) y sólo se pudo intentar la clasificación citológica en 35 (70o/o) De estos últimos logramos diagnóstico específico en 28 casos (80o/o), diagnóstico descriptivo no concluyente en 5 casos (14o/o) y catalogados como positivos por malignidad sin ser subclasificados dos casos (6o/o). Los 28 casos que lograron ser subclasificados corresponden a AAF, los positivos para malignidad corresponden a líquidos pleurales, para los cuales no existió confirmación por biopsia y los descriptivos corresponden a 4 líquidos, de los cuales 2 resultaron ser sarcomas y 2 procesos linfoproliferativos. No hubo falsos positivos.

Arbitrariamente dividimos los casos de acuerdo con el fijador empleado: alcohol etílico al 95o/o en treinta casos (60o/o), y acetona pura en veinte casos (40o/o). En tres de los casos ambos fijadores fueron utilizados, correspondiendo a un 60/0 del total.

En los primeros casos fijados en alcohol, los estudios con EMA y LCA resultaron ser poco fructíferos, debido a la excesiva tinción del fondo y la ausencia de control interno en las muestras, aunque los controles usados en todos los casos resultaron positivos. Al obtener tan pobres resultados se modificó el tiempo de fijación, incrementándolo de 15 minutos a una hora y luego disminuyéndolo a cinco minutos, y en ninguno de los ensayos hubo resultados adecuados.

Posteriormente al tripsinizar las muestras, y aun cambiando la dilución de la tripsina, no se logró disminuir la tinción del fondo, para permitir la adecuada evaluación del caso. En otro grupo se decidió el uso de la acetona continuando la fijación de algunas laminillas en alcohol en forma simultánea como referencia. Se realizaron cambios con la temperatura, y estas pruebas con el alcohol y la acetona a loC no mostraron resultados satisfactorios; sin embargo la fijación con acetona a 25oC mostró evidencia clara de positividad con gránulos intracitoplasmáticos claramente apreciables con ambos anticuerpos monoclonales. (Fig. 1, 2).

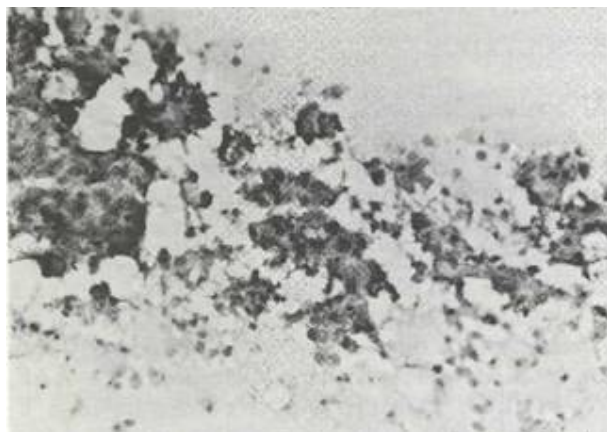


Fig., 1. Se aprecia la cohesividad característica de las lesiones epiteliales. Nótese la tinción citoplasmática. Al igual que la figura 2, corresponde al caso No. 2. (x 200).

Con el método AFAAP los resultados son adecuados, lográndose la visualización de los gránulos intracitoplasmáticos, con alguna acentuación a nivel de la membrana celular. Debido a un diferente cromógeno, se produce un excelente contraste con res-



Fig. 2. A mayor aumento se evidencia el patrón granular de la reacción y la limpieza del fondo (x400).

pecto a la escasa tinción del fondo, lo cual facilita en algún grado su interpretación (Fig. 3).

Al obtener resultados adecuados con las muestras fijadas en acetona, se decidió buscar una correlación con los tejidos correspondientes, la cual se obtuvo en 14 casos de los que existía bloque de parafina en el archivo.

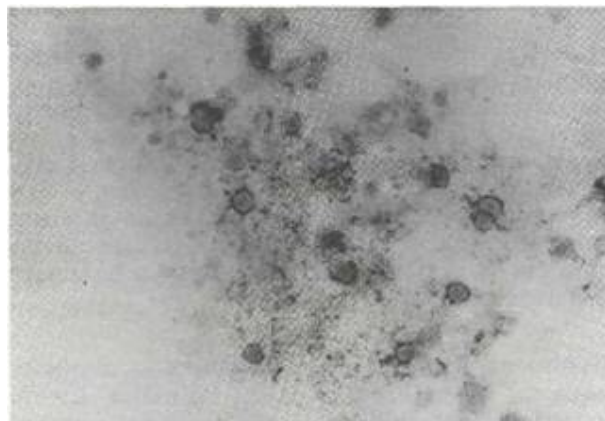


Fig. 3. Método AFAAP. Impronta de ganglio linfático (fijado en acetona), reemplazado parcialmente por linfoma linfocítico. Resulta clara la positividad del LCA a nivel de la membrana celular en las células tumorales monomórficas carentes de cohesividad. (x 400).

Los casos de parafina fueron teñidos con los mismos anticuerpos, 96o/o de ellos evidenciaron idénticos resultados a los obtenidos con el material

citológico. (Figs. 4, 5, 6). El único caso (4o/o) en el cual esto no se logró, correspondió al caso previamente fijado en B5\*. Con este fijador siempre existe una tinción difusa, no necesariamente granular que impide una adecuada interpretación y puede llevar a resultados falsos positivos (Fig. 7). El resto de los casos se fijaron en formalina, la cual mostró ser un excelente fijador, que permite la adecuada evaluación del material en parafina. (13, 15). Aunque ha sido establecido que el mejor fijador para este propósito es la solución de Bouin(14, 15).



Fig., 4. Coloración de Hematoxilina y Eosina del caso No. 2, que muestra el carcinoma ductal infiltrante invadiendo el tejido celular subcutáneo de la mama, (x 40).

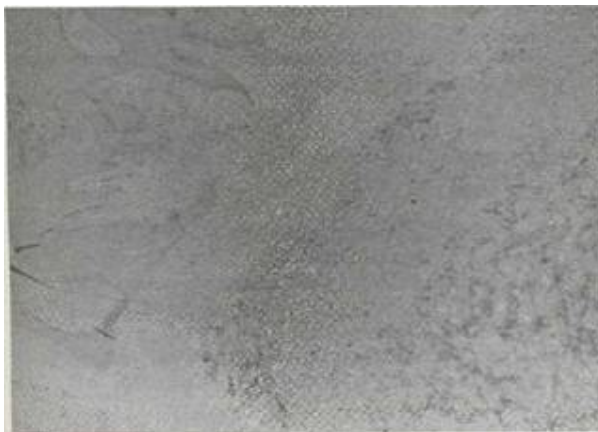


Fig. 5. El caso No. 2, tenido con LCA. Se aprecia la negatividad de las células tumorales y los linfocitos positivos como control interno, (x 40).



Fig. 6. En esta micro fotografía resulta evidente la positividad tumoral para EMA. (x 40).

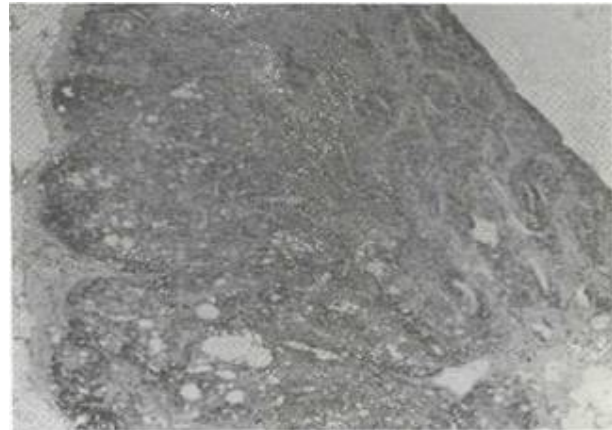


Fig. 7. Se ejemplifica claramente la inespecificidad de los resultados obtenidos con material fijado en B5. Nótese la distribución difusa de la coloración café.

Para ilustrar los resultados decidimos utilizar como modelo el caso No. 2 (fijado en acetona) de la Tabla No. 1. En este ejemplo se aprecia la positividad de la reacción para EMA, corroborando su origen epitelial (Figs. 1, 2), habiendo resultado negativo el LCA apreciándose únicamente control interno positivo. Los resultados en el tejido son absolutamente idénticos (Figs. 4, 5, 6).

En un caso de esta naturaleza, únicamente se pretende demostrar la confiabilidad del método desde el punto de vista técnico, ya que con criterios pura-

TABLA No. 1

CASO	CITOLOGIA		TEJIDO		DIAG. DEFINITIVO
	EMA	LCA	EMA	LCA	
1	+	CI	-	CI	Adenocarcinoma seroso papilar de ovario.
2	+	CI	-	CI	Carcinoma ductal infiltrante de glándula mamaria.
3	-	CI	-	-	Leiomiocarcinoma uterino
4	-	CI	CI	CI	Leiomiocarcinoma de vejiga
5	+	CI	+Pocas	-	Adenocarcinoma gástrico
6	+	-	+	-	Adenocarcinoma gástrico
7	-	CI	+Lumen	-	Adenocarcinoma de colon
8	-	TF	-	CI	Feocromocitoma
9	-	CI	TF	TF	Linfadenitis (B5)
10	CI	CI	-	CI	Teratoma maduro de ovario
11	-	CI	-	CI	Ganglio Linfático reactivo
12	-	CI	-	CI	Adenocarcinoma de colon
13	TF	CI	+	CI	Adenocarcinoma de recto
14	-	CI	+Lumen	-	Carcinoma hepatocelular

CI: Control Interno  
TF: Tinción del Fondo

mente morfológicos de AAF, se hace el diagnóstico. Lo relevante es que el método puede resultar de enorme valor en casos de tumores in diferenciados y de patrones morfológicos atípicos. En este estudio, en casos igualmente evidentes desde el punto de vista morfológico, no se logró obtener resultados inmunocitoquímicos similares cuando el fijador utilizado fue alcohol.

## CONCLUSIONES

1. La biopsia aspirativa por aguja fina debe considerarse como un importante método diagnóstico en la práctica rutinaria de la clínica, por su alta correlación con los resultados histopatológicos, y por las inherentes ventajas de fácil acceso y bajo costo que son bien conocidas.

2. En conjunto con la radiología moderna, la biopsia aspirativa por aguja fina brinda una evidente ampliación del espectro citopatológico.

3. Este método además juega un importante papel en el seguimiento de pacientes con diagnósticos establecidos.

4. La inmunoperoxidada puede implementarse en forma rutinaria simultáneamente con la citología, para aumentar la certeza diagnóstica.

5. Se recomienda el uso de acetona pura a temperatura ambiente como fijador en los casos a evaluar con inmunoperoxidasa, y asimismo el uso de alcohol etílico al 95o/o para la evaluación morfológica de los mismos, mediante Papanicolau.

6. Se considera de suma importancia la incorporación de estos métodos diagnósticos en la formación y práctica diaria del patólogo latinoamericano.

Agradezco la generosa colaboración de las siguientes personas: Dr. Mehrdad Nadji, Sra. Mary Rosa, Sra. Fay Mucha, Sta. Lillian Planas, Dra. Manijen Moezzi, Dra. Jocelyn Ziegels-Weissman, Dra. María Rodríguez, Dra. Estella Defortuna, y Dra. Esperanza de Herrera.

## REFERENCIAS

1. Guthrie C.G. Gland puncture as a diagnostic measure. Bull Johns Hopkins Hosp 32:266,1921.
2. Curran R.C., Gregory J.: The unmasking of antigens in paraffin sections of tissue by trypsin. Pro Experimentis 33: 10,1977.
- 3 Taylor C. R.: Inmunomicroscopy: A Diagnostic tool for the Surgical Pathologist. Vol. 19 Series Major Problems in Pathology, W.B. Saunders Co., 1986.
4. Moir D. J., Ghosh A.sK., Abdulaziz Z., et al. Immunoenzymatic Staining of haematological samples with monoclonal antibodies. B. J. Haematol 55: 395, 1983.
5. Erber W.N., Pinching A. J., Masón O. Immunocytochemical detection of T and B cells populations in routine blood smears. Lancet 1: 1042,1984.



- Hsu S.M., Raine L, Farger H. A comparative Study of the PAP method and Avidin-Biotin Complex method for studing polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75: 734,1981.
- Hsu S.M., Raine L, Farger H.: The use of Avidin-Biotin peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem Cytochem* 29:577,1981.
- To A.,Coleman D.V.: Use of antisera to epithelial membrane antigen for cutodiagnosis of malignancy in serous effusions. *J. Clin. Pathol* 34: 1326-1332, 1981.
9. Cordell, J.R.: Immunoenzymatic labeling of Monoclonal Antibodies using immune complex of Alcaline phosphatase and monoclonal Anti alcaline phosphatase (APAAP Complexes). *J. Histochem, Cytochem* 32,219. 1984.
10. Battifora H-, Trowbridge I.: A monoclonal antibody useful for the differential diagnosis between malignant lymphoma and non- lymphopoyetic neoplasms. *Cáncer* 51: 816-821,1983.
11. Borowitz M.S., Stevanovich G, et al.: Differential diagnosis of undifferentiated malignant tumors with monoclonal antibody T 29/33. *Human Pathology* 15: 928-934,1984.
12. Nadji M., Morales A.,: Immunoperoxidase techniques. A practica! approach to tumor diagnosis. American Society of Clinical Pathologists Press. Chicago, 1986.
13. Taylor, O. Immunoper oxidase techniques. Practical and Theoretical aspects. *Arch Pathol Lab Med*, Vol 102.March 1978.
14. Nadji, M., Morales A., Immunoperoxidase. Part I. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 1983: 14:767-71.
15. Nadji, M. Immunoperoxidase techniques. *Am J Dermatopath* 8(1) 32-36,1986.