

# MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA SU ESENCIA Y SU EMPLEO EN MEDICINA

Por el

Dr. H. Hamperl

*Medizinische Klinik*, núm. 47-48, pág. 781, 1943. [611-018].

**D**ESDE que Abbe desarrolló hasta su plenitud actual el microscopio ordinario y mostró, al mismo tiempo, los límites físicos precisos de su poder resolutivo, no han faltado ensayos para trasponer estos límites o, al menos, para traspasarlos por un rodeo, de igual manera que el árbol, que ya no puede crecer más en altura, trata de expandirse en todas direcciones. Origináronse así la microscopia en campo oscuro y la microscopia ultravioleta, en la que se consigue un aumento del poder resolutivo con el empleo de las más pequeñas longitudes de onda de los rayos ultravioleta (UV), pero, de todos modos, a costa de la visibilidad de la imagen, la cual sólo puede ser recogida sobre la placa fotográfica sensible a dichos rayos. Los fenómenos luminosos que se presentan en muchas sustancias sometidas a los rayos UV estimularon a la construcción de microscopios de mayor rendimiento, con cuya ayuda fuese posible continuar la observación de dichos fenómenos en el campo de las dimensiones microscópicas. Se creó así el microscopio de fluorescencia, cuyo desarrollo técnico ha conseguido hoy un cierto término, aunque su empleo se amplíe cada vez más.

Por fluorescencia se entiende, en el lenguaje corriente, el fenómeno de que una sustancia emita rayos luminosos propios bajo la irradiación ultravioleta, es decir, que en cierto modo, es el fenómeno de transformación de una luz invisible en otra vi-

sible. Si se desea producir este fenómeno en no importa qué cuerpo, se precisa disponer de un manantial de luz que sea suficientemente rico en rayos UV, puesto que la intensidad de la fluorescencia depende de la intensidad de aquellos rayos. Ya nuestras lámparas ordinarias de arco de carbón suministran abundantes rayos UV, y, de hecho, se las utilizó incidentalmente como fuentes luminosas productoras de rayos UV. La producción de éstos puede ser aumentada esencialmente utilizando electrodos de hierro en lugar de los de carbón. Particularmente rico en rayos UV es el tubo de la lámpara de cuarzo. Además, tiene la ventaja, enfrente de las lámparas de arco, de dar una luz más regular. Se ha conseguido fabricar lámparas de fluorescencia. En todas estas fuentes hay que eliminar los rayos de luz visible por medio de filtros adecuados. Se emplea, al efecto, el cristal negro con óxido de níquel como elemento principal. Así, se obtiene la luz UV filtrada; respectivamente la llamada "luz Wood".

Hay que tener en cuenta que la intensidad de la fluorescencia irradiada por un objeto es muy pequeña, comparada con la luz del día, aun cuando se emplee luz UV filtrada muy intensa. De aquí la necesidad de eliminar la luz ordinaria del día y de trabajar en la oscuridad. En estas condiciones se puede observar ya a simple vista una serie de fenómenos de fluorescencia. De esta manera se han conseguido en Medicina importantes conocimientos relativos a la orina y al *liquor*, y también se ha aplicado, en Dermatología, al diagnóstico. Es notable el comportamiento de la sangre, que no es fluorescente o, dicho de otro modo, absorbe los rayos UV. El suero sanguíneo puro da una fluorescencia de tono entre el azul pálido y el gris. Como el fenómeno no se observa en la sangre total, se infiere que la masa principal de ésta está formada por los no fluorescentes glóbulos rojos. Esta propiedad depende del contenido en un

metal pesado: del hierro de la molécula hemoglobínica. Si se libera el hierro o se ensayan los compuestos precursores de la hemoglobina reaparece en seguida la fluorescencia. Así, por ejemplo, la porfirina, sustancia madre de la hemoglobina, se caracteriza por una neta fluorescencia rojiza, que se puede provocar fácilmente en la cáscara del huevo de gallina. La fluorescencia natural de esta sustancia es, pues, reprimida, extinguida, por la presencia de otra.

En muchos casos es deseable, e incluso necesario, proseguir el estudio de los fenómenos de fluorescencia en el campo de las dimensiones microscópicas y localizarlos exactamente. En principio, se pudiese pensar en la falta de posibilidad del intento, porque la escasa intensidad de muchas fluorescencias microscópicas se hunde ya bajo el nivel de la perceptibilidad a la observación con lupa; pero la luz UV se puede concentrar también por medio de un sistema de lentes, de modo que se reúnan sobre un campo pequeño, cuya fluorescencia se eleva así considerablemente. Con este procedimiento, Ellinger y Hirt han podido analizar admirablemente la fluorescencia de tejidos vivos bajo las más diversas influencia y estados metabólicos. Particularmente dignos de nota son los resultados obtenidos respecto del comportamiento de las vitaminas y de la secreción en el hígado y en los riñones.

Mas el procedimiento de los autores citados sólo permite un examen superficial, por así decirlo, de los tejidos vivos. Era por esto deseable adaptar al procedimiento de la microscopia de fluorescencia nuestros métodos histológicos ordinarios: la confección de cortes de tejidos muertos y fijados. La idea guía debe ser, naturalmente, la de conservar inalterados, en la técnica empleada, todas las propiedades fluorescentes de los tejidos.

La solución ideal son los cortes por congelación. En el empleo de los fijadores hay que eliminar los que contienen metales

pesados. El mejor es la formalina (Policard). Como medios de inclusión sólo pueden emplearse líquidos no fluorescentes. Puede bastar el agua destilada. Como ésta hace desaparecer las sustancias fluorescentes hidrosolubles de los tejidos, se obtienen mejores resultados con la inclusión en glicerina pura no fluorescente o en glicerina-agua. Para ciertos fines se puede usar la inclusión ordinaria en parafina.

Sin embargo, antes de que podamos observar la fluorescencia microscópica en un tal corte histológico, hay que hacer algunas modificaciones en el microscopio. Debemos tratar de hacer llegar a la preparación una luz UV lo más rica y convergente posible. Para esto pueden servir de espejo cóncavo y el condensador ordinarios. Pero, puesto que el vidrio ordinario no es completamente transparente para la luz UV y hasta puede originar fluorescencia, el condensador debe ser de un medio permeable a dicha luz. Hoy se emplea, sobre todo, el cuarzo; pero como los vidrios empleados actualmente en los condensadores comunes poseen para los rayos UV de onda larga, los únicos que aquí entran en consideración, la misma permeabilidad que el cuarzo, resulta superflua la construcción de condensadores especiales. Como entre el condensador y la preparación se halla todavía el portaobjetos, hay que proveer a que éste no absorba rayos UV o fluoreszca. También se pensó por esto que sería necesario el uso de portaobjetos de cuarzo, pero hoy sabemos que basta con los de vidrio corriente. Naturalmente que a través del preparado y del objetivo alcanzan hasta el ocular los rayos UV, siquiera sea en cantidad reducida. De todos modos, resultan lo suficientemente abundantes para despertar la fluorescencia de las lentes de nuestros propios ojos y la observación es perturbada por la luz nacida en nuestros mismos órganos visuales. Estos rayos UV hacen imposible, asimismo, la obtención de una imagen de los lugares fluorescentes,

puesto que ennegrecen las placas difusamente. De aquí que haya de colocarse sobre el ocular un filtro "tupido" para los rayos UV.

Las imágenes de fluorescencia que se obtienen, por fin, con tal dispositivo se distinguen, sin embargo, en muchos respectos, de las que nos suministra la microscopia ordinaria: las estructuras fluorescentes no toman su luz de otro manantial, sino que lucen ellas mismas, destacándose sobre el fondo oscuro de los elementos no luminiscentes del tejido. Pero, puesto que de todas las estructuras del tejido sólo se ven aquellas que emiten fluorescencia, es, a menudo, difícil localizar y reconocer, como tal, cualquier elemento del tejido por la simple imagen fluorescente. Nos ayudamos para ello haciendo pasar la luz ordinaria a través de la preparación después de separar el filtro para los rayos UV para tratar de reconocer la situación de un punto fluorescente del tejido previamente fijado con exactitud. Esto no es siempre ciertamente fácil, puesto que por lo común tenemos ante nosotros un corte no coloreado. Como los sitios fluorescentes envían su luz en todas direcciones, se echan de menos los contornos precisos de la observación ordinaria y solamente se ven puntos o rayas resplandecientes, como las estrellas en el cielo de la noche. Otra particularidad de la imagen en la microscopia de fluorescencia es la gran debilidad luminosa, puesto que el sistema de lentes sólo conduce al ocular una parte pequeña de los rayos emitidos. Con todo, el autor ha conseguido muchas veces microfotogramas, por una exposición hasta de media hora y con el empleo de *films* extraordinariamente sensibles. Se obtienen, pues, imágenes gráficas que no tienen nunca, naturalmente, la objetividad, aquí tan importante, de la placa fotográfica. Un medio auxiliar consiste en poder determinar con exactitud el color de la fluorescencia por el ocular espectral de Abbe o por el ocular fotométrico de Has-

chek y Haitinger. La mayor precisión se logra con el microespectrómetro universal de Konnigsdorffer.

Sólo raramente se presenta una fluorescencia rojiza en los tejidos animales. No obstante, esta coloración es manifiesta y característica en la porfirina. En los adultos humanos se presenta la fluorescencia rojiza, en circunstancias normales, en la raíz de los pelos y uñas. La presentación de la porfirina en estos lugares es hasta ahora inexplicable. En las edades juveniles la porfirina se encuentra en todas aquellas partes en que se comprueba todavía una hematopoyesis embrionaria. Así, en el hígado, en el que la desaparición de ésta se acompaña de la extinción de la fluorescencia. Los eritrocitos fluorescentes son muy escasos en la sangre normal (por bapo un 1 por 1.000); en las anemias son muy frecuentes y se interpretan como un signo de regeneración sanguínea. Los depósitos copiosos de porfirina han sido analizados por Borst y Konigsdorffer en la porfiria congénita.

La melanina no es nunca fluorescente, mientras que la llamada lipofucsina se ilumina en tonos que varían desde el amarillo brillante hasta el pardo oscuro. Se podrían ordenar estos pigmentos en una serie, desde la no fluorescente, y por consiguiente, de aspecto negro, melanina, hasta la lipofucsina, que se ilumina con el más brillante amarillo, pasando por los que se iluminan sólo débilmente, por ejemplo, en las fibras musculares lisas de la vesícula seminal. Puesto que ni con la ayuda de otros métodos de investigación, por ejemplo, la impregnación argéntica, se puede trazar una línea estricta de separación entre lipofucsina y melanina, un discípulo del autor, Sachs, trató de ver si se podía establecer una separación clara en cualquier lugar de la escala de color de la fluorescencia. Esto se consiguió con la ayuda de un artificio sencillo, pero fundamental en microscopia de fluorescencia, a saber: el ensayo de mo-

dificar la fluorescencia natural por acciones químicas sobre el correspondiente pigmento. Si se oxidan en el corte los diferentes pigmentos, se comprueba que algunos pigmentos no alteran su comportamiento, ni bajo una oxidación intensa, a la luz UV. Así, la melanina, tal como se presenta en piel y en las cubiertas (Hüllen) del sistema nervioso central. Los restantes pigmentos pardos, las lipofucsinas, adquieren por la oxidación, incluso cuando anteriormente no fluorescían o apenas si eran fluorescentes, un color de fluorescencia amarillo brillante.

Según las investigaciones de Ellinger y Hirt, era particularmente seductor seguir sobre las preparaciones la distribución de las vitaminas en las células. Como en los procedimientos para la obtención de los cortes, éstos se colocan siempre en contacto más o menos prolongado con el agua, apenas si es de esperar que queden conservadas las vitaminas hidrosolubles. Sólo son, pues, perceptibles las vitaminas liposolubles, en cuanto son capaces de fluorescencia, y, en primer plano, la vitamina A. Desgraciadamente, su fluorescencia se agota rápidamente bajo la acción de la luz y especialmente de los rayos ultravioleta, de modo que no posible alcanzar la prolongada exposición necesaria para su registro sobre la placa fotográfica. De todos modos, contamos con una serie de observaciones de microscopia de fluorescencia sobre el metabolismo de la vitamina A, el papel de la misma en el ojo, la carotinosi experimental y la presencia de vitamina en los tumores. La estrecha conexión e incluso la identificación de la vitamina A con una sustancia luminosa, en el contenido graso de los órganos y de las células, aparece particularmente clara en las investigaciones sobre el hígado.

La microscopia de fluorescencia juega un papel especial en la comprobación de las sustancias aportadas del exterior, cuyas más pequeñas cantidades escapan a la comprobación por

otros métodos, y que llaman la atención por su fluorescencia. Los procedimientos de fluorescencia pertenecen, pues, a los métodos analíticos más sensibles. Así, v. Jancso ha podido seguir el ingreso y el depósito de ciertos medicamentos en los tripanosomas. Haitinger y Hofsatter establecen con este método la profunda penetración de Flavidín en la mucosa uterina humana. El propio autor de este artículo ha podido utilizar la microscopia de fluorescencia para la comprobación de las sustancias cancerógenas fluorescentes en los tejidos y en las células. Por medio de la fluorescencia se pudo seguir la permanencia y el destino del benzopireno depositado a gotas sobre la piel del ratón.

También se ha tratado de seguir macro y microscópicamente la presencia del benzopireno introducido con la alimentación por medio de la fluorescencia. A este objeto se alimentan ratones con semillas sobre las cuales se ha dejado caer una gota de solución oleosa de benzopireno. Ya poco tiempo después se podía comprobar en las células adiposas (por ejemplo, la grasa subcutánea) la fluorescencia típica. La corteza suprarrenal parece jugar un papel especial en la aceptación y almacenamiento del benzopireno. Es interesante, además, que ya una a dos horas después de la comida se puede observar una fluorescencia azul en la bilis. La sustancia, absorbida en el intestino, ha pasado, pues, al hígado y ha llegado a la bilis. El análisis espectroscópico de esta fluorescencia ha enseñado que se encuentra un espectro de absorción muy parecido, pero con todo claramente distinto, al del benzopireno. Con otras palabras: el benzopireno absorbido en el intestino no es nuevamente segregado, sino también transformado, por el hígado. Lo mismo se puede decir respecto al riñón y la orina, respectivamente.

La íntima unión del benzopireno a las sustancias grasas de las células sugiere la idea de emplearlo como sustancia en cierto modo colorante para los cuerpos lipídicos, en los cortes. De hecho, se ha conseguido por la introducción de los cortes durante breve tiempo en una solución de benzopireno, un enriquecimiento de la grasa en dicha sustancia y, lo que es más importante, sólo en la grasa, de modo que resplandecen electivamente en el microscopio de fluorescencia. Se tiene así un modo de procedimiento de *coloración* comparable a los métodos ordinarios en histología, y esto tanto si las respectivas sustancias son coloreadas a la luz ordinaria como si no lo son. Haitinger lo resume bajo la designación de fluorocromo y denomina el proceso *colorante* "fluorocromización". Ellinger y Hirt utilizan en sus trabajos con el microscopio de fluorescencia Fluorescina y Tripaflavina. El autor ha podido comprobar la idoneidad de sustancias particulares muy florescentes para la representación, en la microscopia de fluorescencia, del núcleo, vainas de mielina, moco, grasa, etc. De estos fluorocromos son desde entonces tan conocidos el Auramín, el Primulín y el Berberín, entre otros, que Hagemann los ha empleado para la representación de los bacilos tuberculosos en los *frotis*, y Hompesch, en los cortes de parafina. También para la representación de los corpúsculos elementales (especies de virus) se han mostrado útiles. Haitinger y colaboradores han probado con el método del autor otros fluorocromos.

Inconveniente del método es la escasa estabilidad de las *coloraciones*.

Cuando actualmente tal cual investigador que a costa de grandes sacrificios se ha proporcionado un microscopio de fluorescencia se declara defraudado por los resultados conseguidos, olvida que la culpa no la tiene la propia microscopia de fluorescencia, sino el que uno se haya prometido de ella lo que no pue-

de dar. Las cuestiones no resueltas por la microscopia ordinaria no lo pueden ser, sin más, por la de fluorescencia. La importancia de esta última está más bien en regiones ciertamente mal limitadas, pero determinadas, de las cuales al autor le parecen las de más relieve las siguientes:

1. La comprobación de una propiedad, sólo revelable por ella, del tejido: la fluorescencia; y

2. La posibilidad de hacer aparentes las más pequeñas cantidades de sustancia y de localizarlas, lo que a veces consiente una comprensión de orden químico. Precisamente en este último campo le parece al autor que existen aún las mayores posibilidades para la investigación.

(per "Bibl. Méd. Inter.", 3.049.)

---

#### *Pulverización de sulfanilamida contra el dolor de la laringitis tuberculosa*

El dolor de la tuberculosis laríngea está muchas veces producido por la infección secundaria de las úlceras. La pulverización de 30 a 65 centigramos de polvo de sulfanilamida resulta en la desaparición del dolor, con lo que se permite la deglución, con la consiguiente mejora del estado nutritivo de los enfermos, lo cual basta a veces para cambiar radicalmente el aspecto desesperado de los pacientes. El autor ha tratado con el citado procedimiento a 60 enfermos, y obtuvo resultados excelentes, a menos que existiese pericondritos de los cartílagos aritenoides; en 14 de los sujetos el proceso general era muy avanzado, a pesar de lo cual la terapéutica resultó de suma eficacia. (JAMA, abril 1946, R. C. España.)