



VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet

Del 1 al 31 de octubre de 2005



Uso de la nitrocelulosa en las tinciones citológicas. Presentación de una tinción "inteligente"

Rafael Alba Fernández*

* . REPUBLICA DOMINICANA

Resumen

Introducción

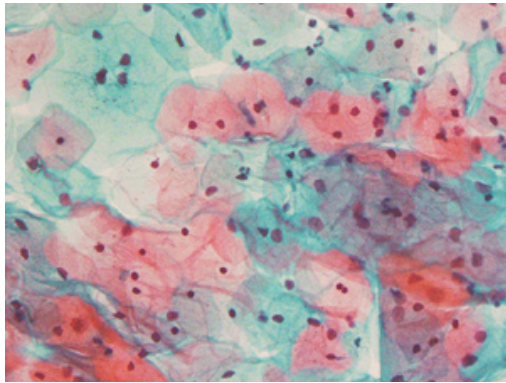
INTRODUCCION La tinción de papanicolaou usa tres colorantes: 1º Hematoxilina de Harris, para teñir el núcleo. 2º OG6. (para teñir el citoplasma). 3º EA50 (para teñir el citoplasma). En el proceso de cambio de un colorante a otro se dan varios pasos de alcoholes. Al final se hace una deshidratación progresiva hasta llegar a alcohol absoluto. Esto va seguido de aclaramiento con xilol y un montaje que lleva resina y cubreobjeto. En este trabajo proponemos: - Una tinción que ahorra el uso de los alcoholes en los pasos intermedios entre los distintos colorantes. - El uso de la laca de la nitrocelulosa en sustitución de los alcoholes, del medio del montaje y del cubreobjeto en la etapa final. De esta investigación se generó una coloración que discrimina células normales de las atípicas por la coloración del núcleo y por la alteraciones de color del citoplasma; avisa la presencia de agentes patógenos y predice precozmente la diferenciación de las células tumorales, razón por la que la denominamos "una coloración inteligente"

Material y Métodos

MATERIAL Y METODO. A- Hematoxilina de Harris B- Pincel del ancho del cubreobjeto. (3/4 de pulgada.). C- Laca natural con brillo de nitrocelulosa* - Thinner AAA 2000 ** D- Secador de pelo con aire fresco natural. E- Tolueno. F- Biebrich Scarlet soluble en agua (B.S.) G- Eosina soluble en agua. H- Acido Phosphotungstico (A.P.) I- Acido acético glacial. J- Ligth Green. K- Orange G. L- Alcohol de 95%. PREPARACION La nitrocelulosa se prepara. - 60% de nitrocelulosa. - 30% de thinner 2000. - 10% de tolueno (opcional)**. El Biebrich Scarlet se prepara para 100 ml. - 100 ml de agua destilada. - Biebrich Scarlet soluble en agua 0.5 gr. - Acido phosphotungstico 0.5 gr. - Acido acético glacial 1 ml. La eosina se prepara. - 100 ml de agua destilada. - 0.5 gr. De eosina acuosa. - Acido phosphotungstico 0.5 gr. - Acido acético glacial 1 ml. Tinción Ligth Green, orange G (L.G - O.G) *. - 100 ml de alcohol de 95% diluido al 50%. - Ligth Green 0.1 gr. - Orange G 0.25 gr. - Acido phosphotungstico 0.5 gr. - Acido acético glacial 1 ml. TINCION ALBA CON NITROCELULOSA. VERSION PAPANICOLAOU. - Las preparaciones fijadas con spray deben ser sumergidas en agua por una hora para sacar la laca del fijador. - Las fijadas con alcohol se procesan directamente. - Alcohol etílico de 95% sumergir 10 veces. - Lavar en agua varias veces. - Hematoxilina de Harris 2 Min. - Lavar en agua hasta sacar el excedente del colorante. - Eosina 4 Min. - Lavar en agua hasta sacar el excedente del colorante. - Coloración L.G - O.G. 2 Min. - Lavar en agua hasta sacar el excedente del colorante. - Para facilitar el secado, sumergir 10 veces en el alcohol que se usó en el paso anterior a la hematoxilina. - Aplicar el secador de pelo con aire natural sin sacar las plaquitas de la canastilla. - Aplicar con el pincel la laca de nitrocelulosa. VERSION SHORR'S MODIFICADA "UNA TINCION INTELIGENTE". - Las plaquitas fijadas con spray se deben sumergir en agua por una hora para sacar la laca del fijador. - Las fijadas con alcohol se procesan directamente. - Alcohol etílico de 95%, sumergir 10 veces. - Lavar en agua varias veces. - Hematoxilina de Harris 2 Min. - Lavar en agua hasta sacar el excedente del colorante. - Biebrich Scarlet. 2 Min. - Lavar en Agua varias veces hasta sacar el excedente del colorante. - Coloración L.G - O.G 2 Min. - Lavar en agua varias veces hasta sacar el excedente del colorante. - Para facilitar el secado, sumergir 10 veces en el alcohol que se usó en el paso anterior a la hematoxilina. - Aplicar el secador de pelo con aire natural sin sacar las plaquitas de la canastilla. -Aplicar con el pincel la laca de nitrocelulosa.

Resultados

RESULTADOS En la coloración en donde se uso eosina se consiguieron los colores de la tinción de papanicolaou tanto en las células superficiales como en las intermedias, variando los colores con el uso y con los ajuste del tiempo de la coloración. Las células superficiales se tiñeron de un color naranja a rosado y la intermedias de un color verde En la tinción de shorr´s modificada "una tinción inteligente", el color del citoplasma de las células superficiales se tiño de un color rojizo pálido y el de las células intermedias y parabasales, de color verde. Llamó la atención que el núcleo picn-ótico de las células superficiales se tiño de rojo al igual que algunos coilocitos y de otras células parabasales y metaplásicas. En las demás los núcleos se tiñeron normalmente con la hematoxilina. Se identificaron dos tipos de células con cambios coilociticos: - Coilocitos con núcleos que mostraron cromatina condensada de color rojo - Coilocitos con núcleos atípicos.

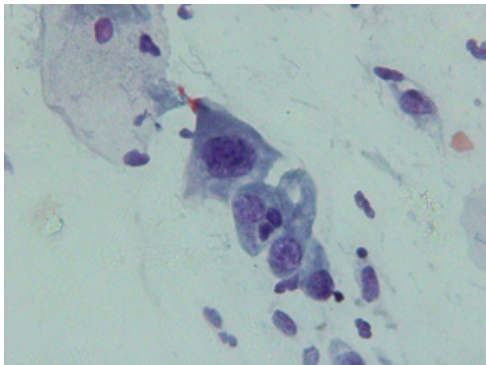


Version Papanicol

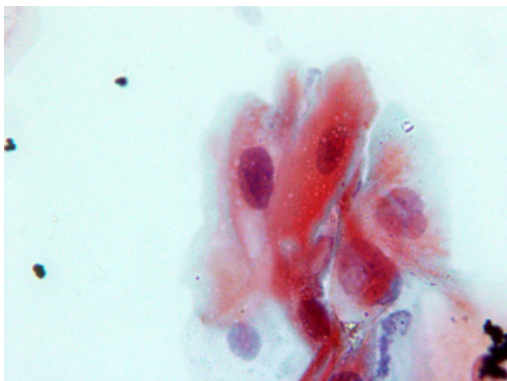
Discusión

DISCUSIÓN La coloración de Shorr´s es una coloración policromática que se usaba para hacer estudios citohormonales los colorantes están todos ligados en un solo paso con la siguiente formula - Alcohol Etilico de 95º 100 ml. - Orange g 0.25 gm. - Biebrich Scarlet soluble en agua 0.5 gm. - Fast green fcf 0.075 gm. - Acido phosphotunstico 0.5gm. - Acido phosphomolydico 0.5 gm. - Acido acético glacial 1 ml. La coloración preparada en esta forma (sin usar Hematoxilina) tiñe de rojo los núcleos de todas las células y los citoplasmas de las células superficiales. Los citoplasmas de las células intermedias y parabasales se tiñen de verde. Para adecuarla a nuestra técnica y darle un uso de tinción de contraste, dividimos la coloración en dos pasos: 1º B.S. disuelto en agua con ácido phosphotunstico y ácido acético en las proporciones indicadas en la técnica ó eosina soluble en agua al 0.5%. 2º a. Alcohol etilico al 50%, 100 ml b. Ligth Green 0.1 gm - Orange G 0.25 gm - ácido phosphotunstico 0.5 gm - ácido acético glacial 1 ml. (Ver cuadro) Cambios realizados a la tinción de Shorr´s a. Hematoxilina de Harris para teñir el núcleo. b. Se separa el B.S. ó se usa Eosina (si se quiere la versión papanicolaou). c. Con los reactivos restantes se prepara la tinción L.G – O.G. d. En un alcohol al 50% e. Se sustituye el Fast Green por el ligth Green para reproducir la tinción de papanicolaou. f. Se elimina el Acido phosphomolydrico Esta separación nos da libertad para cambiar los tiempos de exposición a los colorantes En ambas versiones el tiempo que se debe de dar en los colorantes que tiñen el citoplasma, es un equilibrio entre la eosina, o el Biebrich Scarlet con el orange G de la coloración LG – OG. Ese equilibrio nos dá la tonalidad deseada de las células superficiales. Asimismo se aumentan o se disminuyen los tiempos para conseguir la tonalidad del verde de las células intermedias Aunque la mayoría de los libros describen la coloración de Shorr´s en alcohol de 95% nosotros preferimos la del manual of cytotechnology, en la que se utiliza el alcohol al 50% con mejor funcionamiento. Al separar la tinción, la parte compuesta por la coloración LG – Og se preparó en un alcohol al 50% . La preparación de la coloración ligth Green / Orange G en alcohol de 50% permite niveles altos de hidratación ya que los colores empiezan a definirse con un 10% de concentración de alcohol. La coloración de papanicolaou tradicional preparada en alcohol es una coloración compleja ya que hay que preparar stock de los diferentes ingredientes que luego son mezclados para así obtener los colorantes que serán usado. Todo este proceso conlleva un control de calidad y un tiempo de trabajo que hace poco práctica su elaboración individual y por tal motivo hay que comprarlos preparados lo que encarece considerablemente dichos productos. La coloración que proponemos tiene la siguientes ventajas: 1. Tiene una formula sencilla y fácil de preparar. 2. No tiene fecha de caducidad ya que los reactivos se preparan cuando se van a usar. 3. Define muy bien los colores (ver fotos) 4. El frotis no se limita al tamaño de un cubreobjeto. 5. Tiene un buen rendimiento, con 250 ml, se tiñeron más de mil frotis . 6. Es muy económica ya que no usa alcoholes, xilol, medio de montaje, ni cubreobjetos. La Tinción de Shorr´s modificada "Una Tinción Inteligente" es una tinción muy interesante ya que el B.S. compite con la Hematoxilina de Harris en la tinción del núcleo. Ella solamente logra teñir los núcleos que presentan cambios degenerativos o algunas sustancias que interfiere con la Hematoxilina de Harris en el teñido de los ácidos nucleicos. El hecho de que los núcleos se tiñan de manera distinta nos permite discriminar entre células normales y atípicas. Usualmente las células que presentan problemas de interpretación en los frotis citológicos son aquellas que muestran cambios

degenerativos o que sus núcleos aparecen mal teñidos porque la Hematoxilina no interactúa adecuadamente con estos. El uso de esta tinción reduciría el número de casos que comúnmente se interpretan como "ASCUS" es decir frotis de interpretación dudosa o de anomalía no específica. A nivel del citoplasma la tinción muestra algunos cambios interesantes ya que avisa la existencia de moniliasis por la presencia de células que tienen vacuolizaciones y fragmentación del citoplasma. En las N.C.I. el color del citoplasma varía de acuerdo al tipo de lesión ya que predice si la lesión será queratinizante o no queratinizante ya que en las lesiones queratinizantes las células tienen el citoplasma rojo pálido mientras que en las lesiones no queratinizantes el citoplasma es de color verde. Todas estas cualidades son las razones por las que la hemos denominado "una tinción inteligente". Entre las células cuyo núcleo se tiñen de rojo, aparecen unas que muestran cambios coilocíticos, estas últimas presentan cuatro estadios: a. Al principio se forma un hueco perinuclear. El núcleo aún preserva cromatina rugosa sin embargo ella se va tornando roja, preservándose el tinte verde citoplásmico. b. En el segundo estadio hay una mayor condensación de la cromatina y se hace más evidente el rojo nuclear. El citoplasma se mantiene verde. c. En el siguiente estadio el núcleo a fijado su coloración roja en tanto el citoplasma varía entre verde y rojizo. d. Finalmente tanto el núcleo como el citoplasma asume un tinte rojo total quedando la célula convertida en una unidad muerta. Aparte de las ventajas que se expusieron en la versión de papanicolaou, la coloración de Shorr's modificada: 1º Define mejor los diferentes tipos de coilocitos. 2º Orienta hacia el tipo de diferenciación celular. 3º Ofrece una coloración citológica superior. Recomendamos que al prepararse los reactivos se tengan las coloraciones de B.S. y de eosina para usar la versión de Shorr's en los frotis ginecológicos y la versión de papanicolaou en los demás frotis. En lo relativo a la nitrocelulosa debemos recordar que su uso original fue como componente de la pólvora y otros explosivos. Su síntesis está ligada a la de la nitroglicerina. Es un producto de la esterificación de la celulosa (molécula polimérica de alto peso molecular) de origen vegetal en donde se utiliza el ácido nítrico en un medio deshidratante. Posteriormente se aprovechó su buena solubilidad en disolventes oxigenados (éteres y cetonas) de alta volatilidad, para obtener pinturas, llamadas lacas, de muy rápido secado, que forman películas de alta resistencia y alto brillo cuando un formador de film entra en la composición. Por su elevada dureza y rigidez, debe ser plastificada para que la película tenga la flexibilidad y tenacidad necesarias. La excelente resistencia al paso del tiempo y a las diferentes condiciones ambientales hacen de la laca nitrocelulósica un material ideal para cubrir preparaciones histológicas y citológicas. La película de laca pierde muy lentamente su plastificante por segregación lo que da lugar a que se formen microfisuras con el transcurrir de los años (de 10 a 15 años), ello puede minimizarse manteniendo las preparaciones a temperaturas por debajo de los 30º celcius y evitando la exposición directa a la luz solar. Varias semanas después de su aplicación la película de laca muestra una leve coloración amarillenta por las resinas alquídicas que las acompañan, este tinte no constituye un problema serio desde el punto de vista óptico, debido a que el escaso grosor de la película evita que ello interfiera con la observación de los colores de la coloración subyacente. Las lacas acrílicas no presentan la coloración amarillenta. La laca de la nitrocelulosa es un producto no estandarizado por lo que pueden haber variaciones en las diferentes fábricas de pintura. Lo mismo que en el thinner, sin embargo, la adición de tolueno para mejorar su eficiencia en brillantez y secado no debe sobrepasar más del 10%, ya que el tolueno le quita la viscosidad y endurece el pincel dificultando su aplicación.



Células de Lesión de alto grado no queratinizante



Células de lesión de alto grado queratinizante

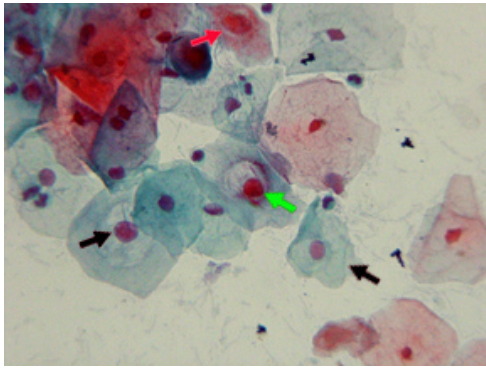


foto a y b Flechas negras, coilocitos estadio 1 flecha verde, coilocito estadio 2 flecha roja, coilocito estadio 4 (Ver también el color rojo de los núcleos picnóticos de las células superficiales)

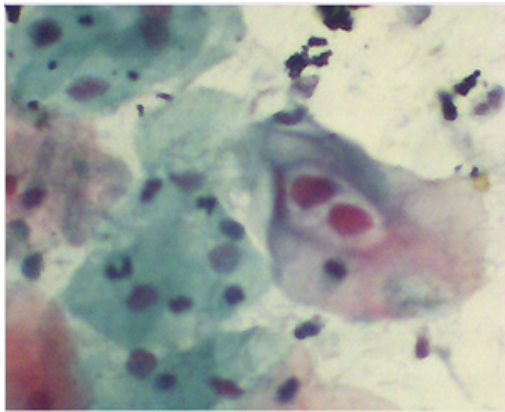


foto c, estadio 3

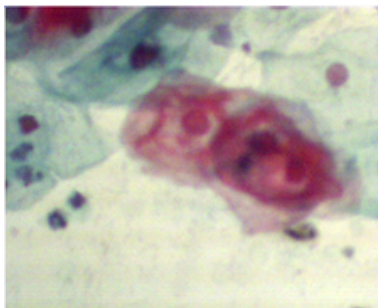


foto d, estadio 4

Conclusiones

CONCLUSIÓN En este trabajo presentamos una tinción citológica versátil que funciona sin alcoholes y con dos versiones distintas para la misma tinción: versión papanicolaou y versión Shorr's modificada, la llamamos inteligente porque en la versión de Shorr's discrimina las células por la coloración del núcleo y nos orienta sobre el tipo de diferenciación celular.

Agradecimientos

Al Dr Sergio Sarita Valdez, por la gran ayuda prestada. Al Dr Sixto Recavarren, mi profesor y amigo.