



Nº 886. Conferencia

USO DE LA NITROCELULOSA EN LAS TINCIIONES CITOLÓGICAS, PRESENTACIÓN DE UNA MODIFICACIÓN DE LA TINCIÓN DE SHORR´S DEL PASO ALBA PARA FROTIS LIMPIOS Y DE UN LABORATORIO PORTÁTIL DE CITOLOGÍA.

Dr. Rafael Emmanuel Alba Fernandez^[1]

(1) General de Brigada Médico - Patólogo (Pensionado) Ejército Nacional Ex Jefe del Departamento de Patología del Hospital Central de las Fuerzas Armadas de la República Dominicana REPUBLICA DOMINICANA

Introducción

En los últimos 60 años en el procesamiento de los frotis citológicos se ha usado el alcohol y otros reactivos. La técnica clásica ha sido desde entonces la tinción de papanicolaou.

La tinción de papanicolaou usa tres colorantes:

- 1- Hematoxilina de Harris, para teñir el núcleo.
- 2- OG6. (para teñir el citoplasma).
- 3- 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 elimina 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
- El uso de un laboratorio portátil para darle más versatilidad a la tinción.

Esta investigación generó una variación en la tinción de Shorr´s con las siguientes características:

- Frotis Limpios
- Identifica cambios citoplásmicos de células que acompañan a la moniliasis.
- Excelente diferenciación citoplásmica.
- Identifica dos tipos de coilocitos, coilocitos con nucleos rojos y coilocitos con nucleos atípicos.

En la primera parte de esta presentación trataremos de ubicar la coloración en la realidad del tercer mundo y la manera de insertarla en los programas de detección masiva del cancer cérvico uterino para ofrecer una coloración de bajo costo y alta calidad. Posteriormente se hará énfasis en la calidad y versatilidad de la tinción que permitiría una fácil automatización para ser usada en los países desarrollados

Materiales y Métodos

Materiales

- A Hematoxilina de Harris
- B Pincel del ancho del cubreobjeto. (3/4 de pulgada.).
- C Laca natural con brillo de nitrocelulosa (se usó laca natural con brillo de la fábrica de Pinturas Popular de la República Dominicana)
- D Thinner AAA 2000 (Se usó el thinner AAA 2000 de la fábrica Pinturas Popular de la República Dominicana)
- E Secador de pelo con aire fresco natural.
- F Biebrich Scarlet soluble en agua (Ponceau BS)
- G Eosina soluble en agua.
- H Ácido Phosphotugstico (A.P.)
- I Ácido acético glacial.
- J Ligth Green.
- K Orange G.
- L Alcohol de 95%.

Prototipo de un Laboratorio Portátil

En relación al laboratorio portátil tenemos las siguientes ventajas generales:

- No ocupa espacio.
- No necesita la infraestructura de un laboratorio.
- Puede ser utilizado en la casa o un centro de salud.
- En los programas de detección masiva descentralizaría el trabajo haciendo que estos programas sean más eficientes y más fáciles de administrar.
- Facilita el control de los reactivos ya que con 350 ML de cada uno de los colorantes el citólogo debe reportar 1,000 papanicolaous.

Las ventajas técnicas de este laboratorio son:

- Facilidad en el trabajo por tener cerca agua.
- Las plaquitas pueden ser sacudidas enérgicamente por la forma en que están sujetadas.
- Si el colorante no cubre completamente las plaquitas, lo que se deja de teñir es la parte esmerilada.

Preparación de los reactivos

La nitrocelulosa se prepara.

- 60% de nitrocelulosa.
- 40% de thinner 2000.

El Biebrich Scarlet (B.S.) se prepara para 100 ml.

- Biebrich Scarlet soluble en agua 0.5 gr.
- 100 ml de agua destilada.
- Ácido phosphotungstico 0.5 gr.
- Ácido acético glacial 1 ml.

La eosina se prepara para 100 ml. **(Opción 1)**

- 100 ml de alcohol de 95% diluido al 50%.
- 0.05 gr. De eosina acuosa.
- 0.05 gr de Bismarck Brown

La eosina se prepara para 100 ml. **(Opción 2)**

- 100 ml de alcohol de 95% diluido al 50%.
- 0.05 gr. De eosina acuosa.

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.

Paso Alba para frotis limpios

- 100ml de agua destilada
- 2ml de ácido acético glacial

Tincion Alba con Nitrocelulosa.**a) Versión Papanicolaou.****b) Versión Shorr's modificada.**

- En los frotis que no están fijados con alcohol las preparaciones deben de ser sumergidas en agua, 100ml de agua por 2 ml de ácido acético glacial por 30 minutos o más para sacar el fijador y el moco.
- Lavar en agua.
- Alcohol isopropílico o etílico sumergir varias veces.
- Lavar en agua dos o tres veces.
- Acido acético glacial 2ml por cada 100ml de agua, 2 minutos, para los frotis fijados en alcohol .
- Hematoxilina de Harris 4 minutos.
- Lavar en agua hasta sacar el excedente del colorante.
- **Eosina 2 minutos / Biebrich Scarlet 3 minutos.**
- Lavar en agua hasta sacar el excedente del colorante.
- Coloración Ligth Green-Orange G. 4 minutos.
- Lavar en agua hasta sacar el excedente del colorante.
- Aplicar el secador de pelo con aire natural sin sacar las plaquitas de la canastilla.
- Cuando las plaquitas estén bien secas aplicar con el pincel la laca de la nitrocelulosa (Ver Representación Gráfica de la Tinción en Foto N°. 2)

Modo de aplicar la laca

Para aplicar la laca y obtener una capa uniforme se debe de usar un pincel de buena calidad.

- Se introduce el pincel en la laca, se quita el excedente pasando el pincel por el borde del frasco de la laca.
- Se pone el pincel en uno de los extremos del frotis dejando que la laca se deposite en la plaquita y con el pincel extenderla por toda la superficie.
- Se repite este paso.

Nota:

- La laca no se puede usar con cubre objetos.

- Si en el lugar de trabajo no hay aire acondicionado que controle la humedad, cuando hay mucha humedad en el ambiente la laca no se puede usar porque se torna opaca. En estos casos las plaquitas se deben colocar sobre una superficie con una temperatura de tibia a caliente.

El laboratorio portátil está diseñado para ser usado en un lavadero de dos fosas y sus componentes son:



Foto N° 1 Tabla multiuso que hace la función de meseta de trabajo



Foto N° 2. Teñidor y Parrilla Auxiliar Fabricados en parrillas de organizadores de armarios, son fuertes y revestidos de plásticos para que no se oxiden. En la foto se esquematiza la simplicidad de la Tinción Alba en sus dos versiones.



Foto N°. 3 Cubito del teñidor, flechas verdes indican topes que impiden el deslizamiento de los cubitos en la parrilla. Fabricado en Brasil por la fábrica Plasútil. Ref. 769



Foto N°. 4 El cubito del teñidor tiene capacidad de 440 MI, cabe una canastilla de 30 plaquitas. Las plaquitas se tiñen en posición vertical con la parte esmerilada hacia arriba y se sujetan con ligas



Foto N° 5 Bandeja térmica para ser usada en los días que hay mucha humedad en el ambiente para evitar que laca se torne opaca

Resultados

En la coloración en donde se uso eosina se consiguió los colores de la tinción de papanicolaou tanto en las células superficiales como en las intermedias (Ver foto N°. 6). Los colores variaron con el uso y con los ajuste del tiempo de la coloración.

Las células superficiales se tiñeron de un color naranja a rosado y las intermedias de un color verde(5).

En la tinción de Shorr´s modificada el color del citoplasma de las células superficiales se tiñó de un color rojizo pálido y el de las células intermedias y parabasales tomó un tinte verde. Llamó la atención que el núcleo picnótico de las células superficiales se tiñó de rojo así como algunos coilocitos células parabasales y metaplásicas (Ver fotos N°.7). En el resto, los núcleos se tiñeron normalmente con la hematoxilina(1,5).

Se identificaron dos tipos de células con cambios coilocíticos:

- Coilocitos con núcleos que mostraron cromatina condensada de color rojo.
- Coilocitos con núcleos atípicos.

Nota: Llama la atención que los frotis son limpios como si fueran procesados en medio líquido.

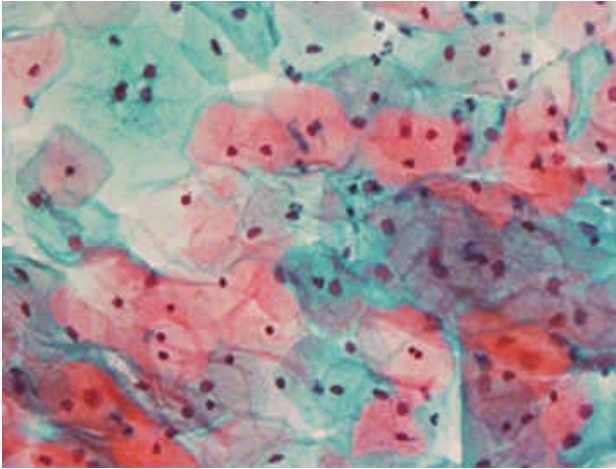


Foto N°. 6 Versión papanicolaou (En esta foto se Prolongó el tiempo de la eosina)

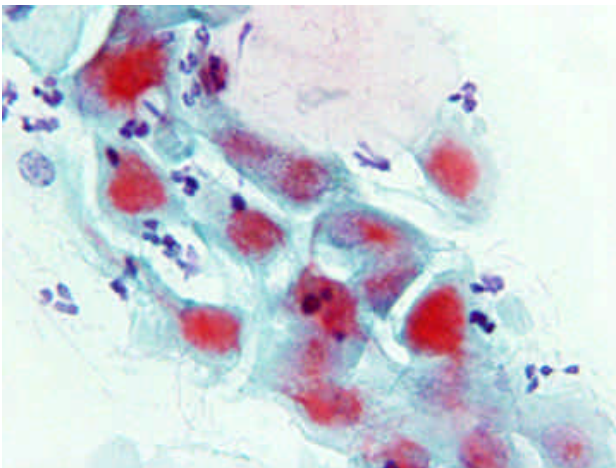


Foto N°. 7 Células metaplásicas con núcleos rojos. (Este efecto se puede minimizar aumentando el tiempo de la Hematoxilina)

COLORACIÓN DE SHORR'S

- Alcohol Etílico de 95° 100 ml.
- Orange g 0.25 gm.
- Biebrich Scarlet soluble en agua 0.5 gm.
- Fast green fcf 0.075 gm.
- Acido phosphotungstico 0.5gm.
- Acido phosphomolybdico 0.5 gm.
- Acido acético glacial 1 ml.

COLORACIÓN ALBA CON NITROCELULOSA

- Hematoxilina de Harris
- B.S. ó Eosina (solubles en agua)
- Tinción L.G. O.G** (resiste niveles bien altos de hidratación)
- Alcohol etílico al 50%, 100 ml
- Ligth Green 0.1 gr.
- Orange G. 0.25 gr.
- Acido phosphotungstico 0.5 gr.
- Acido acético glacial 1ml

Discusión

Nuestro trabajo se realizó modificando la coloración de Shorr´s Cambios Realizados a la Tinción de SHORR´S

Descripción de 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).
 - Con los reactivos restantes se prepara la tinción L.G – O.G.
 - En un alcohol al 50%
 - Se sustituye el Fast Green por el lighth Green para reproducir la tinción de papanicolaou.
 - Se elimina el Ácido phosphomolybdico

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 da 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 (1).

Al separar la tinción, la parte compuesta por la coloración LG – Og se preparó en un alcohol al 50%.

La preparación de la coloración lighth 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 tinción que describimos es una técnica ideal para ser automatizada por las siguientes razones:

- Es muy simple
- Los reactivos usados preparados en agua y en agua y alcohol son muy estables y fáciles de estandarizar.

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 fórmula 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 foto No.6).
- 4.El frotis no se limita al tamaño de un cubreobjeto.
- 5.Tiene un buen rendimiento, con 350 ml, se tiñeron más de mil (1,000) frotis .
- 6.Es muy económica ya que no usa alcoholes, xilol, medio de montaje, ni cubreobjetos.

Una de las características principales de la tinción de Shorr´s modificada es la limpieza que tienen algunos frotis especialmente los fijados en alcohol que pueden ser comparados a los frotis procesados en medio líquido (ver foto No. 10). Esto se debe a que el Biebrich Scarlet está preparado en agua con ácido acético glacial (1ml de ácido acético glacial por 100ml de agua destilada).

En la version de Papanicolaou y en la tincion de Papanicolaou tradicional usamos el ácido acético glacial disuelto en agua (el agua no tiene que ser agua destilada), en una concentración de 2ml de ácido acético glacial por cada 100ml de agua antes o después de la hematoxilina por un tiempo de 2 minutos o como un paso de preparación en los frotis que no están fijados en alcohol con un tiempo de 30 minutos o más.

Los frotis fijados en alcohol o con Polietileno Glicol tuvieron muy buen resultados cuando el fijador cubrió completamente el frotis ya que las áreas no cubiertas por el fijador no se limpiaron adecuadamente.

A pesar de estas limitaciones los frotis mejoraron y en los que estaban fijados adecuadamente obtuvimos los siguientes resultados:

1. Fondo limpio semejante al procesamiento en medio líquido
- 2.Acción selectiva ya que solo actúa sobre el moco sin producir distorsiones celulares y sin eliminar los componentes del frotis, como son: flora normal, agentes patógenos y células inflamatorias
- 3.Mejora la calidad de los colores
- 4.Creemos que debe alargarse la vida útil de los colorantes ya que estos trabajan con más facilidad.

Este procedimiento aplicable a todas las tinciones lo hemos llamado paso Alba para frotis limpios

Nota: este procedimiento lo descubrimos tres semanas antes de iniciarse este congreso por lo que no ha tenido el tiempo de prueba adecuado, me gustaría tener las opiniones que puedan tener ustedes.

A nivel del citoplasma la tinción muestra algunos cambios interesantes, cuando hay moniliasis se observan células con vacuolisación y fragmentación del citoplasma; estas carcazas de células muertas acompañan con mucha frecuencia a la moniliasis lo que facilita su diagnóstico (Ver foto No.8).

La diferenciación citoplásmica es muy buena (Ver foto No.9 10) identificándose fácilmente las lesiones queratinizantes en todos los grados de neoplasia cervical intraepitelial y del carcinoma infiltrante

Entre las células cuyo núcleo se tiñen de rojo, aparecen unas que muestran cambios coilocíticos (2,3,4,9,10,11) estas últimas presentan cuatro estadios:

- a.Al principio se forma un hueco perinuclear. El núcleo aún preserva cromatina rugosa sin embargo esta se va tornando roja, preservándose el tinte verde citoplásmico.
- b.En el segundo estadio hay una mayor condensación de la cromatina haciéndose más evidente el rojo

nuclear. El citoplasma se mantiene verde (Ver foto A).

c. En el siguiente estadio el núcleo a fijado su coloración roja en tanto el citoplasma varia entre verde y rojizo (Ver foto B).

d. Finalmente tanto el núcleo como el citoplasma asume un tinte rojo total quedando la célula convertida en una unidad muerta (Ver foto C).

Aparte de las ventajas que se expusieron en la versión de papanicolaou, la coloración de Shorr´s modificada:

- 1º Es una tinción más limpia
- 2º Define mejor los diferentes tipos de coilocitos.
- 3º Tiene muy buena diferenciación citoplásmica.
- 4º Ofrece una coloración citológica superior.

Nitrocelulosa

En lo relativo a la nitrocelulosa (12) (Sinelnicof, Hugo, Ingeniero Químico de Pinturas Popular, Comunicación Personal) 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 polimera 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.

Hasta finales del siglo pasado la industria automotriz uso la laca de la nitrocelulosa pigmentada para pintar los automoviles y su historia se remonta hasta el famoso Zeppelin Aleman LZ 129 Hindenburg que se incendio por estar pintado con nitrocelulosa que es muy inflamable.

Todos estos años de multiples usos industriales avalan la laca de la nitrocelulosa que por la excelente resistencia al paso del tiempo y a las diferentes condiciones ambientales hacen de la laca nitrocelulósica un material ideal para cubrir preparaciones 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 ya que desde el punto de vista óptico, 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 fabricas de pintura.

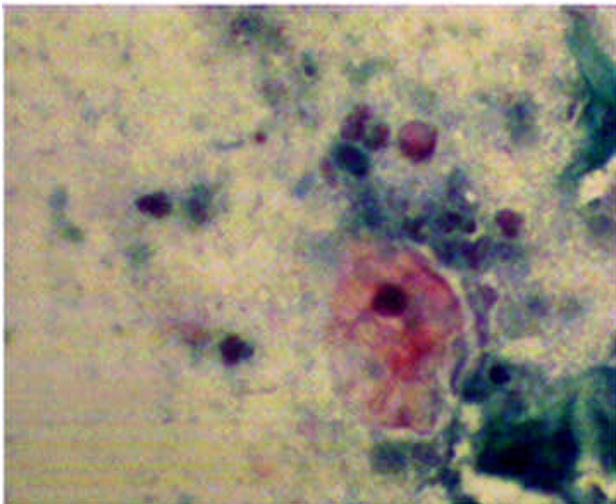


Foto N°8 Cambios citoplásmicos por moniliasis

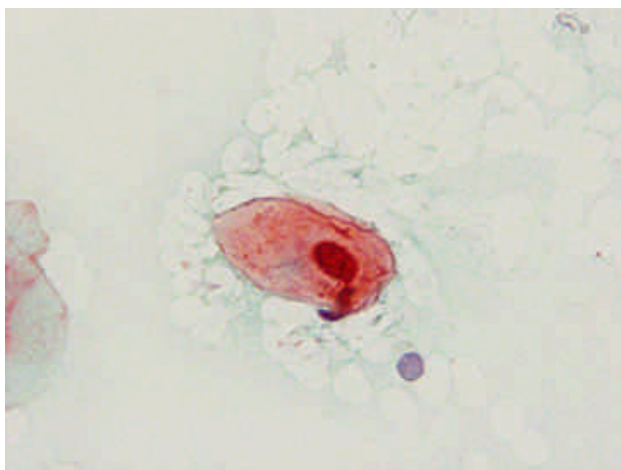


Foto N°. 9 Célula de lesión de bajo grado queratinizante

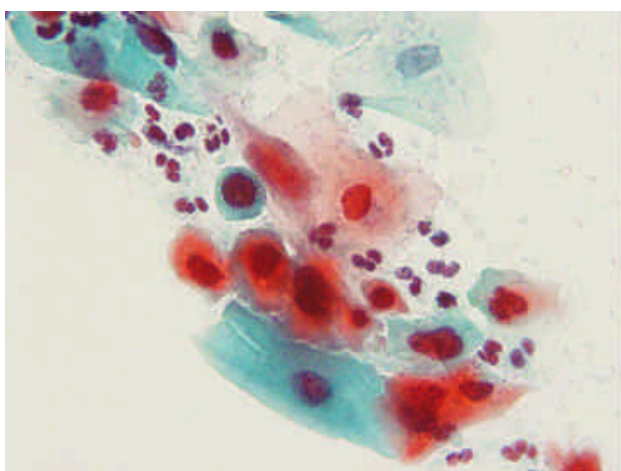


Foto N°. 10 Células de lesión de alto grado queratinizante

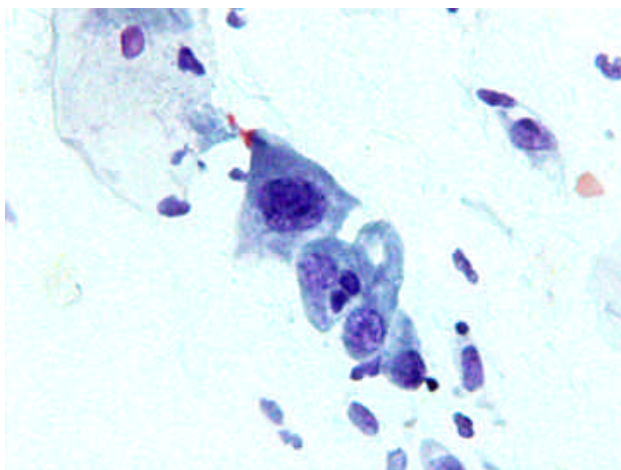


Foto N°. 11 Células de lesión de alto grado no queratinizante

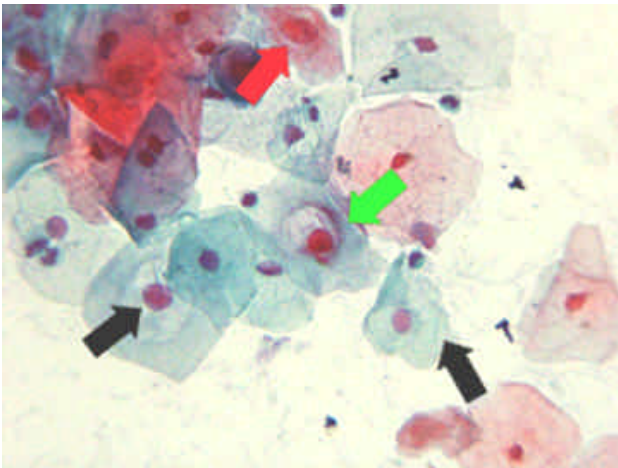


Foto A Flechas Negras: Coilocitos estadio 1 Flecha Verde: Coilocitos estadio 2 Flecha Roja: Coilocitos estadio 4 (Ver también el color rojo de los núcleos picnóticos de las células superficiales)

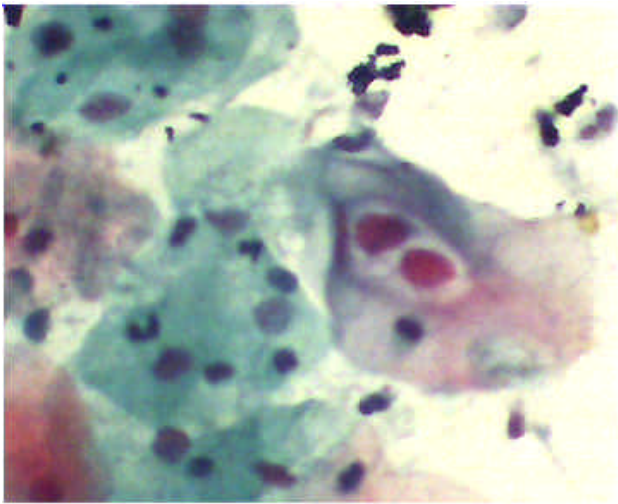


Foto B Estadio 3

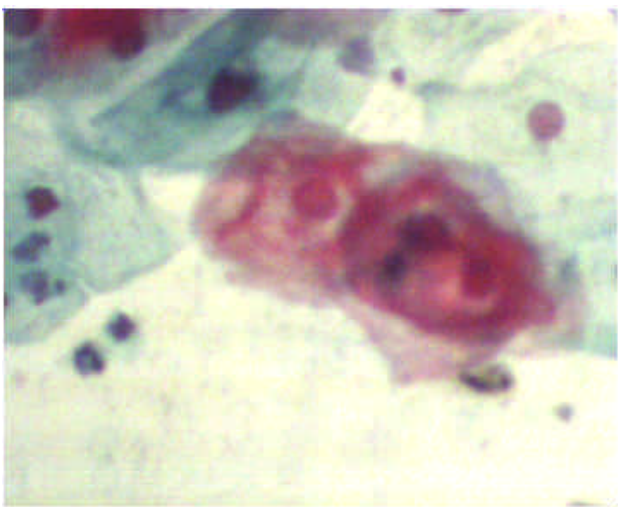


Foto C Estadio 4

Conclusión

En este trabajo presentamos una tinción citológica versátil que funciona sin alcoholes y con dos versiones distintas para la misma coloración: versión papanicolaou y versión Shorr´s modificada la cual aporta a la citología el descubrimiento para preparar frotis limpios y baratos Presentamos también un laboratorio portátil que permite el uso de la tinción en cualquier lugar especialmente en los países del tercer mundo y en los programas de detección masiva del cáncer cérvico uterino

Bibliografía

- 1.Catherine M-Keebler and Theresa M. Somrak. Shorr Stain. Manual of Cytotechnology, 7th Edition. American Society of Clinical Pathology. Chicago. 1997. p. 362.
- 2.De Palo Remoiatti G. Mossetti C. La transformación Anormal de Colposcopia y patología del Tracto Genital inferior 2^a edición, Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1996. p. 175-200.
- 3.Dr. Rodrigo Chuaqui. Anatomía Patológica del Aparato Genital Femenino. Patología Genital del Cuello Uterino. Disponible en URL:
http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/anatomiapatologica/06Genital_fem/6cuello.html
- 4.Dra. María Beatriz Sosa. Epidemiología del V.P.H. 1998. Disponible en URL:
http://latina.obgyn.net/sp/articles/Diciembre99/tema_actual.htm
- 5.Frankel, San, P.H.D. Gradwohls Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. The C. V. Mosby Company 7th Edition. Vol. 1. Saint Louis. 1970. p. 972-975.
- 6.Gill GW. Miller KA Laboratory Techniques for Specimen Preparation, ed 5(rev) Printed for division for Citopathology Department of Pathology, The John Hopkins School of Medicine. Baltimore. 1973.
- 7.O A Husain, J A Millett, and J M Grainger: Use of Polylysine-coated slides for preparation of cells samples for diagnostic Cytology. Technical Methods. USA. 1979. p. 309-311.
- 8.Klinger, H.P. and Ludwing, K.S. Stain tech. Copyright by Williams and Wilkins Co. 32:234. Philadelphia. 1957.
- 9.Reguera M, San Miguel P, Gómez C. y Canal C.. Correlación Diagnóstica entre las Displasias de Cérvix y Detección por PCR del Papiloma Virus Humano. CONGANAT. 2001. Disponible en URL:
<http://conganat.uninet.edu/IVCVHAP/COMUNICACION-E/026/index.html>
- 10.Robert J Kurman, Diane Solomon. The Bethesda System for reporting Cervical Vaginal Cytologic Diagnosis. Springer 1st Edition; Baltimore. 1994.
- 11.Sandra Almirón, Susana Navarro, María Alejandra Rojas - Correlación Citohistológica de la expresión por la infección por el virus papiloma Humano de lesiones Pre-Malignas del Cuello Uterino. Revista de Postgrado de la Cátedra Via Medicina - Facultad de Medicina – UNNE, Editorial Secretaría de Posgrado de la Cátedra VI Medicina. Corrientes – Argentina. Dic. 2003. 134: 19-22.
- 12.Encyclopedia Britannica, Cellulose. William Benton, Chicago. Vol. 5. 1972. p. 141-145.