

Utilidad de la tinción PAS para el diagnóstico histopatológico

Usefulness of PAS-stain in histopathological diagnosis

Tamar Hajar Serviansky,¹ Nicole S. Kresch Tronik,¹ Gabriela Moreno Coutiño,² Roberto Arenas,² Ma. Elisa Vega Memije³

¹ Residente

² Sección de Micología

³ Sección de Dermatopatología

Departamento de Dermatología, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", SS

Fecha de aceptación: octubre, 2012

RESUMEN

ANTECEDENTES: La tinción de hematoxilina y eosina (HE) es comúnmente utilizada en laboratorios de histopatología como instrumento diagnóstico para cortes de piel. Sin embargo, este medio no revela la presencia de ciertos elementos, como fibras elásticas o mastocitos, ni permite diferenciar entre el pigmento melánico y la hemosiderina, por lo que es necesario recurrir a tinciones especiales que incluyen: ácido peryódico de Schiff (PAS, por sus siglas en inglés), útil en la visualización de microorganismos; Gomori-Grocott (metenamina de plata), que permite identificar hongos; y las de Ziehl-Neelsen y Kinyoun, para actinomicetos y micobacterias.¹ De éstas, PAS tiene el mayor potencial de uso en histopatología, ya que tiñe también el glucógeno de la membrana basal de epitelios, anexos, vasos y resalta otras estructuras y células de la piel.

OBJETIVOS: Describir la utilidad de la tinción de PAS en el diagnóstico histopatológico de un servicio de dermatología.

METODOLOGÍA: Se hizo una revisión de 1000 biopsias de piel practicadas en 2008 en el Departamento de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González", y se analizaron los cortes teñidos con PAS.

RESULTADOS: Se revisaron los cortes histológicos de 43 biopsias tomadas de 36 pacientes, las cuales fueron estudiadas con tinción PAS. El diagnóstico inicial en 58% de los estudios fue dermatosis no infecciosa. En el restante 42%, se confirmó la etiología infecciosa en 33.33% de los cortes teñidos con PAS, con 9.3% falsos negativos a la presencia de microorganismos aun cuando los agentes fueron aislados en medios de cultivo (11.6%). De las muestras analizadas con PAS, 18.6% dio positivo a lesiones infecciosas e inflamatorias, como lupus eritematoso discoide.

ABSTRACT

BACKGROUND: The hematoxylin-eosin stain (HE) is a commonly used histopathology tool to analyze skin sections. However, this medium does not bind to elements such as elastic fibers or mast cells, nor does it differentiate between melanic pigments and hemosiderin. Therefore, some diagnostic procedures require special stains, including: periodic acid-Schiff (PAS), to visualize microorganisms; Gomori-Grocott (methenamine silver), for screening fungi; and the and Ziehl-Neelsen and Kinyoun stains, for actinomycetes and micobacterias.¹ Of these, PAS is potentially the most useful, as it binds with basal membrane glycogen and various skin structures.

OBJECTIVE: To describe the usefulness of PAS stain as a diagnostic tool in dermatopathology.

METHODOLOGY: Review of PAS-stained samples from a total of 1000 skin biopsies obtained in 2008 by the Department of Dermatology of the General Hospital "Dr. Manuel Gea González".

RESULTS: The authors reviewed a total of 43 PAS-stained biopsies from 36 patients diagnosed with non-infectious (58%) and infectious (42%) dermatoses. Of the latter, infectious etiology was confirmed in 33.33% of PAS-stained samples, with further 9.3% false-negative results in spite of isolation of infectious agents in culture media (11.6%). In all, 18.6% of PAS-stained samples were positive for infectious and inflammatory lesions, such as discoid lupus erythematosus.

CONCLUSIONS: PAS stain is a useful diagnostic tool for clinically suspected infectious conditions of the skin. However, due to its retrospective nature, this review cannot assess the benefits of PAS in differential diagnosis.

KEYWORDS: PAS, fungi, glycogen, special stains.

CORRESPONDENCIA

Dra. Tamar Hajar Serviansky ■ tamar_hajar@hotmail.com

Calzada de Tlalpan 4800, Col. Sección XVI, C.P. 14080, México D.F.

CONCLUSIONES: La tinción de PAS es de gran utilidad a condición de que el diagnóstico microbiológico clínico esté bien orientado. Dado que el presente artículo fue un trabajo retrospectivo, no reflejó el beneficio de esta tinción para descartar otros diagnósticos diferenciales.

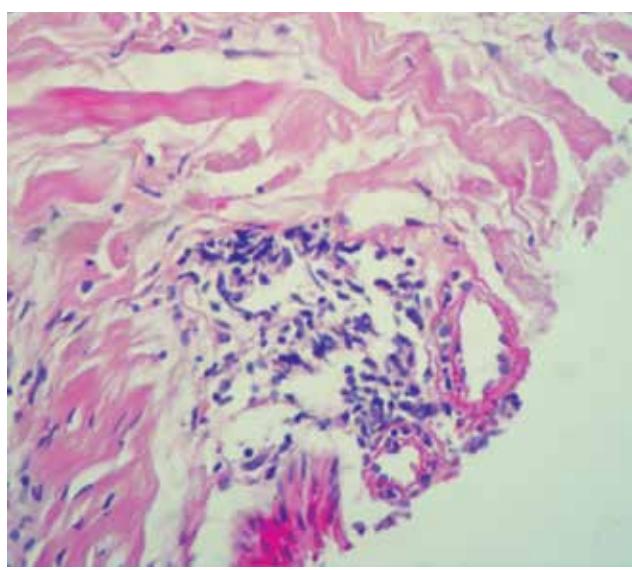
PALABRAS CLAVE: PAS, hongos, glucógeno, tinciones especiales.

Introducción

La tinción de hematoxilina y eosina (HE) se utiliza rutinariamente en histopatología para analizar diferentes tejidos del organismo, incluyendo cortes de piel. Sin embargo, esta técnica no permite apreciar elementos como fibras elásticas o mastocitos, ni diferencia entre pigmento melánico y hemosiderina, de modo que obliga a recurrir a tinciones secundarias o especiales, entre ellas el ácido peryódico de Schiff (PAS), para visualizar microorganismos; la tinción de Gomori-Grocott (metenamina de plata) para hongos; y las de Ziehl-Neelsen y Kinyoun para identificar actinomicetos y micobacterias.¹

Otros medios empleados en la detección de microorganismos incluyen; Giemsa, para *Leishmania*; Wathin-Starry para espiroquetas; y mucicarmín, que tiñe la cápsula de *Cryptococcus* sp.²

Después de HE, la tinción PAS es la más comúnmente utilizada, pues evidencia algunos polisacáridos (particularmente, glucógeno), así como las mucoproteínas que contienen mucopolisacáridos neutros. Esta técnica es útil para valorar la degeneración fibrinoide, ya que tiñe de rojo los depósitos de fibrina (Fotografía 1) y permite visualizar elementos infecciosos como parásitos y hongos²



Fotografía 1. Degeneración fibrinoide de vasos sanguíneos (PAS 40x).

(cuyas paredes de celulosa y quitina contienen polisacáridos).³ Aun así, no es posible diferenciar morfológicamente los dermatofitos y otros mohos con la tinción de PAS, de modo que el cultivo es el único método para identificar el género y la especie del organismo.

Como agente oxidante que rompe algunas cadenas de carbón convirtiéndolas en dialdehídos,^{4,5} la tinción de PAS se considera parte de la histoquímica moderna de mucopolisacáridos, mucoproteínas y polisacáridos. La reacción se debe a que el ácido peryódico oxida las uniones carbono-carbono de los carbohidratos donde hay hidroxilos adyacentes y NH₂ primarios o grupos amino secundarios, cediendo aldehídos que pueden reaccionar con el reactor Schiff, responsable de la coloración roja provocada por la unión de leucofucsina con dialdehido.¹

La demostración del glucógeno con tinción de PAS tiene valor diagnóstico en casos de tumor/quiste triquilemal, triquilemoma, hidradenoma de células claras y poroma ecrino debido al glucógeno presente en las células de la corteza externa del pelo y en las glándulas tanto ecrinas como apocrinas. Entre tanto, la presencia de mucopolisacáridos neutros apunta al diagnóstico de enfermedad de Paget mamaria y extramamaria, hidradenoma de células claras, espiradenoma ecrino intraluminal y poroma ecrino.^{6,7} PAS también se utiliza para revelar la membrana basal de epitelios, anexos y vasos, por lo que es útil para diferenciar o resaltar algunos tipos celulares y la distribución del colágeno entre células neoplásicas.^{7,8}

Por último, la tinción con PAS puede arrojar falsos positivos en algunas dermatosis al teñir de rojo elementos como paraqueratosis, células polimorfonucleares o partículas de almidón.^{9,10}

El objetivo del presente artículo es describir la utilidad de la tinción de PAS en el diagnóstico histopatológico de un servicio de dermatología.

Materiales y métodos

Entre enero y diciembre de 2008, el Departamento de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” de la Ciudad de México realizó un estudio retrospectivo de 1000 biopsias de piel, para el cual fueron seleccionadas las muestras teñidas con PAS identificando los diagnósticos presuntivo y final, así como los resultados de estudios micológicos o cultivos (cuando estuvieron disponibles). Todas las muestras quedaron incluidas en parafina y posteriormente fueron teñidas con la técnica PAS estándar de la siguiente manera: las laminillas fueron desparafinadas e hidratadas con agua y en caso necesario, sometidas a 20 minutos de digestión (10 minutos en ácido peryódico 1%; 10 minutos de enjuague en agua co-

riente para eliminar el ácido). A continuación se aplicó el reactante de Schiff refrigerado a temperatura ambiente, dejándolo actuar 20 minutos para después enjuagarlo con agua corriente. Se procedió a aplicar hematoxilina por un lapso de 1 a 2 minutos, enjuagando con agua; y después se utilizó colorante azul, con posterior enjuague durante unos minutos. Las muestras se deshidrataron con alcohol y xileno y finalmente, fueron montadas en resina sintética para su análisis en el Departamento de Dermatopatología.

Resultados

En 2008 se practicaron un total de 1000 biopsias que fueron analizadas en el Departamento de Dermatopatología.

Del total, se identificaron 43 muestras que sugerían un trastorno del tejido conectivo, por lo que fueron sometidas a tinción PAS para establecer la presencia de elementos fúngicos, amiloïdes o engrosamiento de la membrana basal.

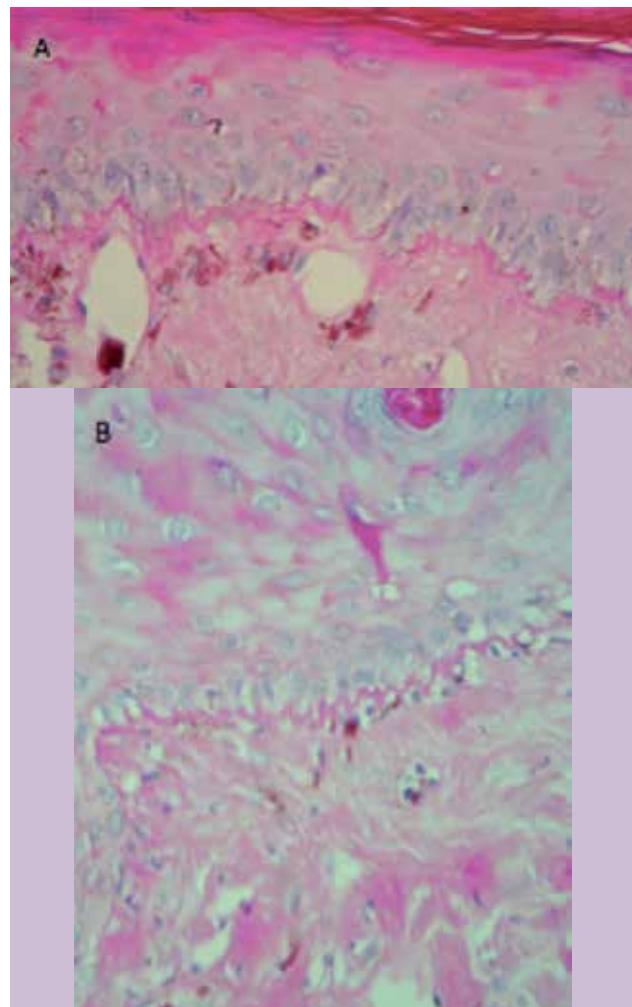
De ellas, se utilizó PAS en 4 biopsias con la finalidad de detectar amiloide como parte del diagnóstico diferencial de liquen amiloide o amiloidosis macular, obteniéndose únicamente un resultado positivo para amiloidosis macular, en tanto que los hallazgos histológicos de las 3 muestras negativas revelaron dermatitis de interfaz vacuolar con caída de pigmento (2 casos), y dermatitis psoriasisiforme espongiforme superficial y media por linfocitos (1 caso).

Se practicó tinción PAS en otros 2 especímenes para confirmar el diagnóstico de collagenopatía (incluidas lupus eritematoso discoide [LED] y dermatomiositis), pero sólo uno presentó engrosamiento de la membrana basal (Fotografía 2), corroborando el diagnóstico presuntivo de LED.

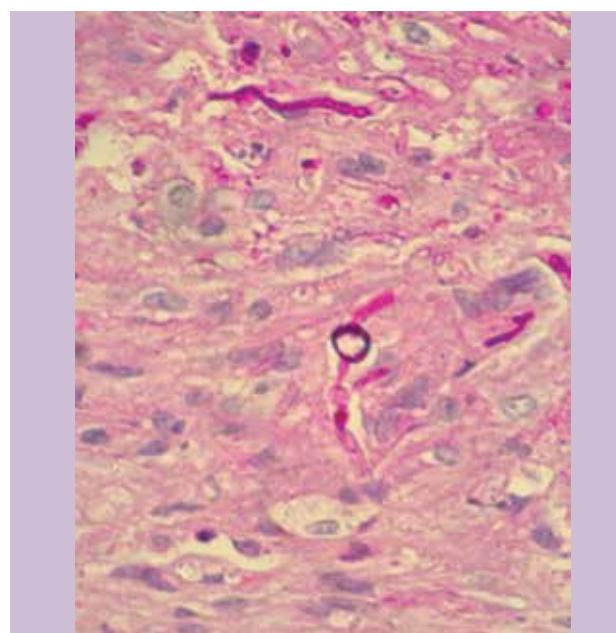
Las 37 biopsias restantes fueron teñidas con PAS para detectar agentes infecciosos que apuntaran al diagnóstico diferencial de micobacteriosis vs. micosis (hifas o levaduras), obteniéndose 9 biopsias positivas. En un espécimen con la impresión diagnóstica de úlcera por calcifilaxis se hallaron abundantes filamentos (Fotografía 3), y el aislamiento de *Curvularia lunata* confirmó feohifomicosis; otro contenía esférulas de pared gruesa y endosporas, compatibles con *Coccidioides sp*; y en uno más fue posible identificar *Histoplasma capsulatum*.

Se utilizó PAS para determinar la presencia de dermatofitos en 2 muestras: una identificada como leuconiquia (Fotografía 4), con cultivo positivo para *T. mentagrophytes*, y otra diagnosticada como tiña interdigital, cuyo cultivo permitió aislar *T. rubrum*.

El cultivo practicado a un paciente diabético diagnosticado con una infección mixta en la zona rinoorbitaria y de senos paranasales, reveló la presencia de *Rhizopus* y *Aspergillus niger*.



Fotografía 2 A y B. Membrana basal (PAS 40x).



Fotografía 3. Feohifomicosis con estructuras fúngicas (AS 40x).

No se observaron elementos fúngicos en las 28 muestras restantes, a pesar de que en los cultivos de dos pacientes se aislaron *Sporothrix schenckii complex* y *Micobacterium marinum*. En ambos casos, el diagnóstico patológico sugirió enfermedad micótica o microbiana con presencia de granuloma supurativo.

El Cuadro 1 muestra los diagnósticos correspondientes a los hallazgos histológicos de muestras positivas a PAS; el Cuadro 2 presenta los resultados negativos para elementos infecciosos, pero con cultivos positivos.

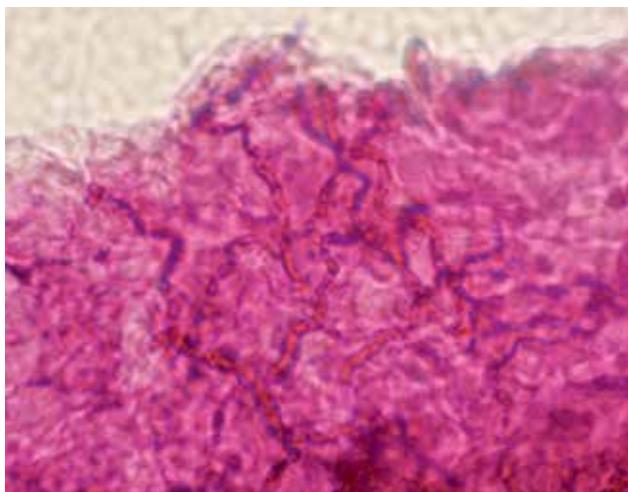
Discusión

PAS, la segunda técnica de tinción más utilizada después de HE, pone en evidencia algunos polisacáridos y mucopolisacáridos neutros tiñéndolos de rojo. Se utiliza para valorar la degeneración fibrinoide y facilita la visualización de agentes infecciosos que incluyen hongos, pará-

sitos y bacterias que desencadenan padecimientos como botriomicosis y el actinomicetoma (Fotografía 5). La visualización del glucógeno presente en las células de la corteza externa del pelo y de las glándulas, tanto ecrinas como apocrinas, tiene valor en el diagnóstico de tumor/quiste triquilemico, triquilemoma, hidradenoma de células claras y poroma ecrino.^{4,2} En tanto, la presencia de mucopolisacáridos neutros apunta al diagnóstico de enfermedad de Paget mamaria y extramamaria, hidradenoma de células claras, espiradenoma ecrino intraluminal y poroma ecrino.^{6,2} Dado que PAS enfatiza la membrana basal de epitelios, anexos y vasos, puede ser útil para diferenciar o revelar algunos tipos celulares, como los histiocitos (Fotografía 6) o la disposición del colágeno entre las células neoplásicas (Fotografía 7). Asimismo, esta técnica puede utilizarse en casos de crioglobulinemia para identificar la presencia de crioglobulinas.¹¹

Cuadro 1. Diagnóstico clínico y hallazgos del estudio histológico en muestras positivas a PAS

DIAGNÓSTICO CLÍNICO	HALLAZGO	CULTIVO	DIAGNÓSTICO FINAL
Absceso micótico	Hifas septadas no ramificadas	<i>Curvularia lunata</i>	Feohifomicosis
Coccidioidomicosis	Esférulas de pared gruesa y endosporas	No se realizó	Coccidioidomicosis
Histoplasmosis	Levaduras intracelulares	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmosis
Eritrasma vs. Tiña interdigital	Esporas	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Tiña interdigital
Leuconiquia micótica	Esporas	<i>T. rubrum</i>	Onicomicosis
Alopecia difusa	Blastosporas en folículos compatibles con <i>Malassezia</i> sp.	No se realizó	Dermatitis seborreica + Alopecia androgenética
Mucormicosis rinoorbitaria	Hifas cenocíticas	<i>Aspergillus niger</i> + <i>Rhizopus</i> sp	Mucormicosis y aspergilosis
Lupus eritematoso discoide	Engrosamiento de membrana basal	No se realizó	Lupus eritematoso discoide.

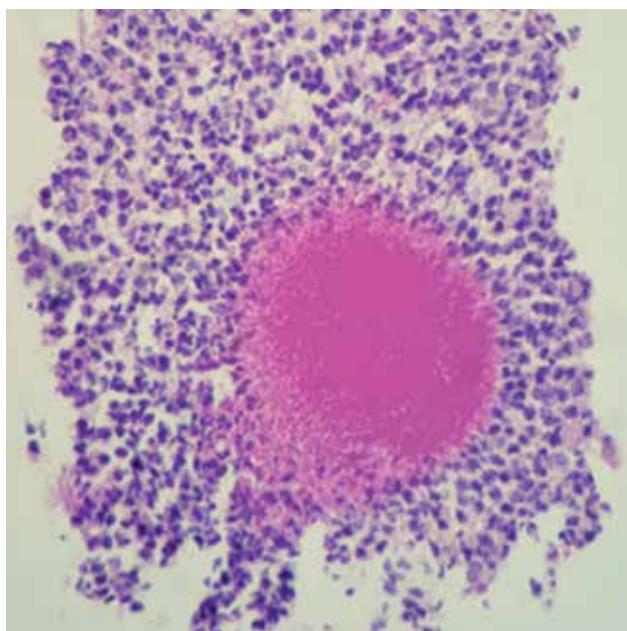


Fotografía 4. Estructuras fúngicas en uña (PAS 40x)

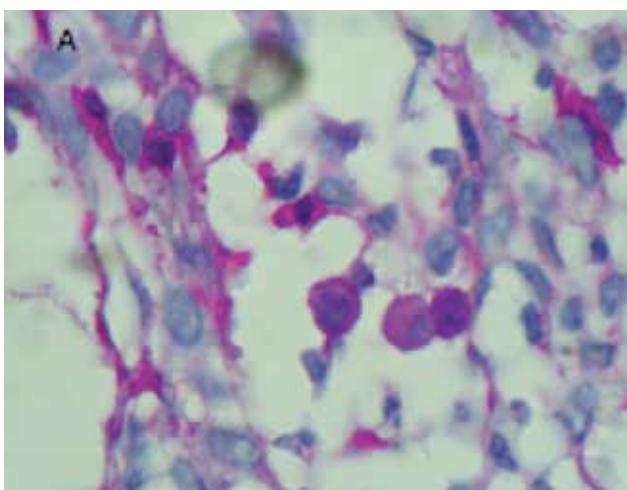
Cuadro 2. Resultados negativos para elementos infecciosos, con cultivos positivos

DIAGNÓSTICO CLÍNICO	CULTIVO	DIAGNÓSTICO FINAL
Esporotricosis vs. micobacteriosis vs. nocardiosis	<i>S. schenckii complex</i>	Esporotricosis
Dermatofibrosarcoma vs. proceso infeccioso infiltrativo	<i>M. marinum</i>	Micobacteriosis atípica
Condritis recidivante	BAAR	Micobacteriosis atípica
Actinomicetoma	<i>N. brasiliensis</i>	Micotoma por <i>N. brasiliensis</i>

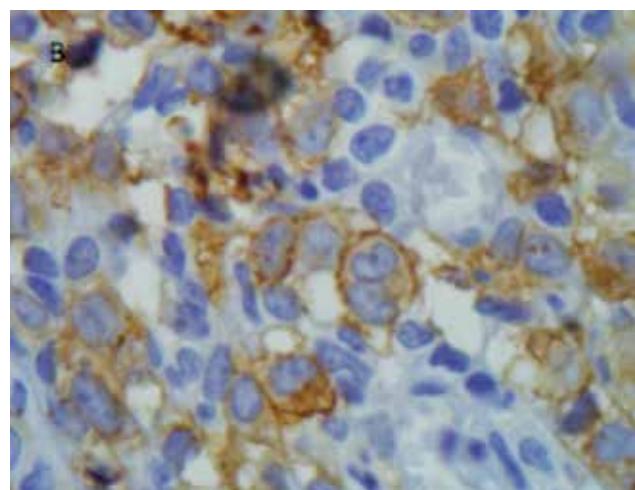
- BAAR: Bacilos ácido-alcohol resistentes



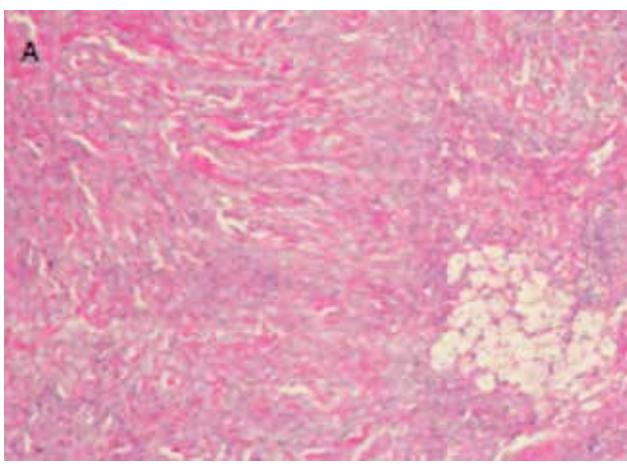
Fotografía 5. Actinomycetoma. Grano de *Nocardia* sp. (PAS 40x).



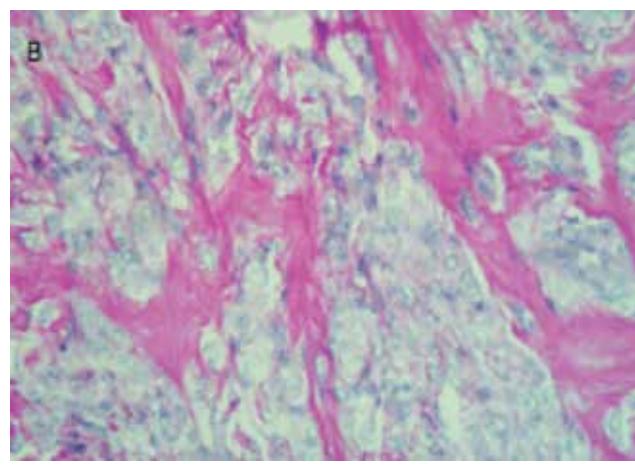
Fotografía 6A. Histiocitos, tinción de PAS 100x



Fotografía 6B. Histiocitos, inmunohistoquímica CD1a.



Fotografía 7. Hidradenoma de células claras. Disposición de las fibras de colágeno entre las células tumorales. (A) Tinción PAS 10x; (B) Tinción PAS 40x.



dos en medios de cultivo (9.3% falsos positivos): de las 28 muestras que no mostraron elementos fúngicos, una produjo un cultivo positivo para *Sporotrix schenckii complex* y en otra se aisló *Micobacterium marinum*. En ambos casos, el diagnóstico histopatológico fue sugestivo de enfermedad micótica o microbiana con la presencia de granuloma supurativo. Pese a ello, estos resultados no descartan la utilidad del PAS, pues se ha documentado que sólo 32% de los cortes histológicos de pacientes con esporotricosis muestran células levaduriformes.¹² Hay que señalar que la tinción de PAS no es específica para micobacteriosis, entidad que requiere de una tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes.

En 18.6% de las muestras, PAS fue positivo tanto para lesiones infecciosas como inflamatorias.

Aunque la tinción de PAS ofrece una alta sensibilidad diagnóstica en onicomicosis (entre 80 y 92%, según diversos informes),¹³⁻¹⁵ el uso de esta técnica no está justificada en nuestro medio debido a las dificultades técnicas y la escasez de personal especializado, de allí que sea más sencillo, rápido y económico practicar un examen directo con hidróxido de potasio (KOH) o con negro de clorazol. Con todo, los autores concordamos en que la biopsia de lámina ungueal teñida con PAS (por sacabocado o fragmentos distales de uña) debe ser el estándar de oro para el diagnóstico de onicomicosis siempre que los exámenes de rutina sean negativos.¹⁶ Para el presente artículo evaluamos únicamente un caso de onicomicosis utilizando procedimientos habituales, aun cuando la técnica PAS se ha utilizado con relativa frecuencia en varias investigaciones llevadas a cabo en nuestro hospital.

Conclusiones

Aunque la tinción PAS es una de las técnicas más comúnmente utilizadas en dermatopatología, su uso no es rutinario y de hecho, se practicó en menos de 5% de los estudios histopatológicos revisados para este trabajo. Si bien nuestra revisión arrojó 9.3% de falsos negativos, los hallazgos de los verdaderos positivos contribuyeron de manera significativa al diagnóstico, de allí que la tinción PAS deba estar disponible en cualquier hospital que cuente con un servicio de patología.

REFERENCIAS

1. Gupta E, Bhalla P, Khurana N, Singh T. "Histopathology for the diagnosis of infectious diseases". *Indian J Med Microbiol* 2009; 27(2): 100-106.
2. Barnhill R, Crowson AN, Magro C. *Dermatopathology*, 3^a ed. Washington, McGraw-Hill, 2010: 458-494.
3. Kligman AM, Mescon H. "The Periodic Acid-Schiff Stain for the Demonstration of Fungi in Animal Tissue". *J Bacteriol* 1950; 60(4): 415-421.
4. Hale AJ. "The Effect of Formalin on the Periodic Acid-Schiff Staining of Certain Types of Mucus". *J Histochem Cytochem* 1955; 3(6): 421-429.
5. Leblond CP, Glegg RE, Eidinger D. "Presence of Carbohydrates with Free 1, 2-Glycol Groups in Sites Stained by the Periodic Acid-Schiff Technique". *J Histochem Cytochem* 1957; v5(5): 445-458.
6. Lever WF, Schaumburg-Lever G. *Histopathology of the Skin*, 7^a ed. Philadelphia, Lipincott, 1990: 45.
7. Ochoa PC, Smith OD, Swerdlow M. "The Dermal-Epidermal Junction; A Preliminary Study with Periodic Acid-Schiff Stain". *AMA Arch Dermatol* 1957; 75(1): 70-77.
8. Sugai SA, Gerbase AB, Cernea SS, Sotto MN, Oliveira ZN, Vilela MA, Rivitti EA, Miyauchi LM, Sampaio SA. "Cutaneous Lupus Erythematosus: Direct immunofluorescence and Epidermal Basal Membrane Study". *Int J Dermatol* 1992; 31(4): 260-264.
9. Singh G, Lavanya MS, "The Reliability of Periodic Acid-Schiff Staining in the Diagnosis of Onychomycosis". *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2009; 75(1): 73.
10. Barak O, Asarch A, Horn T. "PAS is Optimal for Diagnosing Onychomycosis". *J Cutan Pathol* 2010; 37(10): 1038-1040.
11. Nash JW, Ross P Jr, Neil Crowson A, Taylor J, Morales JE, Yunger TM, Magro C. "The Histopathologic Spectrum of Cryofibrinogenemia in Four Anatomic Sites: Skin, Lung, Muscle, and Kidney". *Am J Clin Pathol* 2003; 119(1): 114-122.
12. Ruíz J, Arenas R, Vega ME. "Esporotricosis: Estudio histopatológico de 22 casos". *Dermatología Rev Mex* 1996; 40 (2): 106-112.
13. Wilsmann-Theis D, Sareika F, Bieber T, Schmid-Wendtner MH, Wenzel J. "New Reasons for Histopathological Nail-Clipping Examination in the Diagnosis of Onychomycosis". *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25(2): 235-237.
14. Karimzadegan-Nia M, Mir-Amin-Mohammadi A, Bouzari N, Firooz A. "Comparison of Direct Smear, Culture and Histology for the Diagnosis of Onychomycosis". *Australasian J Dermatol* 2007; 48: 18-21.
15. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutron WD, Tishler HR, Najarian L. "Comparison of Diagnostic Methods in Evaluation of Onychomycosis". *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 193-197.
16. Mayer E, Izak OB, Bergman R. "Histopathological Periodic Acid-Schiff Stains of Nail Clippings as a Second-Line Diagnostic Tool in Onychomycosis". *Am J Dermatopathol* 2012; 34: 270-273.